

THESIS

MUNICH

1966

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES
KNOLLENBLÄTTERPILZGIFTS PHALLOIDIN
AUF DIE ISOLIERTE RATTENLEBER

Ulf Meyer

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. B o d e c h t e l

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES
KNOLLENBLÄTTERPILZGIFTS PHALLOIDIN
AUF DIE ISOLIERTE RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulf Meyer

aus

Jena

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Wieland
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Bodechtel
Dekan:	Prof. Dr. R. Zenker
Tag der mündl. Prüfung:	7.6.1966

Sigmund † und Margarete Meyer gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026.

https://archive.org/details/IA40154016_0088

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS
DES KNOLLENBLÄTTERPILZGIFTS PHALLOIDIN
AUF DIE ISOLIERTE RATTENLEBER.

- - - - -

Einleitung und geschichtlicher Rückblick.

Das Gift des Knollenblätterpilzes hat schon seit langer Zeit in Klinik und Forschung das Interesse auf sich gezogen. Dies hat seinen Grund einmal in der relativen Häufigkeit und dem vielfach tödlichen Ausgang der Knollenblätterpilzvergiftung: Allein in der Bundesrepublik ereignen sich jährlich 50 bis 100 Todesfälle durch Pilzvergiftung. Meist handelt es sich dabei um den grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr., erst in zweiter Linie um den weißen K. (*A. virosa* Lam. ex Secr.), während der gelbe K. (*A. citrina* (Schff. ex Rocques) S. F. Gray ungiftig ist (34). Auch heute verlaufen noch 30 % aller Knollenblätterpilzvergiftungen tödlich, während Todesfälle durch andere ungenießbare Pilzarten verhältnismäßig selten sind (63, 64, 83, 84).

Klinik der Knollenblätterpilzvergiftung

Zum andern fiel schon frühzeitig der eigentümliche klinische Verlauf der Vergiftung auf (63, 64, 94, 95). Die ersten Symptome treten erst nach einer Latenzzeit auf, die bei maximaler Giftdosis nur 1 Stunde, in der Regel aber mindestens 8 bis 14 Stunden und bei geringeren Dosen sogar mehrere Tage betragen kann (24, 30, 63, 64, 68). Danach kommt es zuerst zu gastrointestinalen Störungen in Form von Brechdurchfällen mit Wasser- und Salzverarmung, Oligurie und sogar zur Urämie, zumeist begleitet von schwersten Kreislaufstörungen. Oft treten auch Krämpfe auf. Falls nicht schon in diesem Stadium der Tod eintritt, entwickelt sich nach einer vorübergehenden Besserung eine schwere Leberzellschädigung mit Vergrößerung und Druckempfindlichkeit des Organs, Ikterus und positivem Ausfall der Leberfunktionsproben. Im Urin finden sich oft

Zeichen einer Nierenbeteiligung (Eiweiß, Erythrozyten, Zylinder). Der Blutzucker-Spiegel reagiert in vielen Fällen mit einer initialen Hyperglykämie, danach kommt es zu einer andauernden Hypoglykämie (67, 94, 95). Der Tod erfolgt meist im Leberkoma nach 2 bis 4 Tagen (62,63). Bei der Sektion findet sich eine toxische Verfettung der parenchymatösen Organe (Leber, Niere, Myocard), oft auch eine tubuläre Nephrose, stets jedoch schwere Leberveränderungen von fettiger Degeneration bis zur akuten hämorrhagischen Leberdystrophie (24, 63, 64, 67, 94, 95).

Chemie der Giftstoffe

Den Bemühungen um die Reindarstellung des Knollenblätterpilzgifts (73, 114) gelang es schliesslich, 6 verschiedene Toxine zu isolieren, die schneller wirkenden, chemisch nahe miteinander verwandten Substanzen Phalloidin, Phalloin und Phallacidin, und das langsamer wirkende jedoch toxischere Amanitin, das in eine alpha-, beta- und gamma-Komponente zerfällt. Bis 1959 konnte auch die chemische Natur dieser Stoffe weitgehend aufgeklärt werden (114), wobei die Strukturformel des Phalloidins gesichert ist. Es handelt sich um ein bizyklisches Oligopeptid aus 7 Aminosäuren mit einer Thioamidbindung, durch deren Sprengung die Giftwirkung aufgehoben werden kann ("Desthiophalloidin"); dies ist jedoch ebenso der Fall, wenn durch Sprengung an anderer Stelle das monozyklische Derivat des "halboffenen" Phalloidins entsteht. Somit sind genaue Vorstellungen über den Zusammenhang zwischen Struktur und biochemischer Wirkung noch nicht möglich.

Die Gewinnung der Hauptbestandteile des Knollenblätterpilzgifts, Phalloidin und alpha-Amanitin, in ausreichenden Mengen ermöglichte weitaus genauere Untersuchungen über deren Wirkungsweise. Die zahlreich vorliegenden Befunde lassen sich wegen der Verschiedenheit der Versuchsbedingungen oft schwer vergleichen, womit vor allem eine Aussage über die zeitliche Reihenfolge der Erscheinungen und somit über den primären Angriffs-

punkt des Giftes sehr erschwert wird. In der vorliegenden Arbeit soll im Zusammenhang mit anderen am hiesigen Institut durchgeführten Untersuchungen versucht werden, für das Phalloidin zur Klärung dieser Frage beizutragen..

Bisherige experimentelle Befunde

Im folgenden soll ein Überblick über die bisherigen Untersuchungen vermittelt werden. M. Vogt (105) konnte zeigen, dass sich durch Injektion von Phalloidin bei Mäusen die typischen von der Pilzvergiftung her bekannten Symptome hervorrufen lassen, so die Latenzzeit bis zum Wirkungseintritt, die initiale Hyperglykämie mit nachfolgendem Blutzuckerabfall, Adynamie, Krämpfe und die schwere Leberverfettung, die jedoch nur bei längerer Gifteinwirkung ausgeprägt ist (105, 109).

Nach Giftdosen, die schon in 3 bis 4 Stunden tödlich wirken ebenso wie bei Tieren, die sich nach subletalen Dosen wieder erholen, findet sich nie eine Leberverfettung (54, 105). Matschinsky (54) beobachtete statt dessen bei Mäusen und Ratten eine schwere hämorrhagische Leberdystrophie mit gewaltiger Blutanschoppung des Organs. Ihre Ursache wird in einer Kapillarwandschädigung durch das Gift gesehen, die durch Bluteindickung (67) und Blutversacken in Leber und Splanchnikusgebiet zum akuten Kreislaufversagen und damit zum Tod führt (54).

Wie weitere Versuche ergaben, setzt das Gift die Syntheseleistung für verschiedene Stoffwechselprodukte stark herab. Matschinsky (54) konnte bei Ratten 2 1/2 Stunden nach Injektion von 1 gamma/g Phalloidin keine Leberglykogen mehr nachweisen. Der Blutzucker war nach vorübergehender Erhöhung um 25 % zum Zeitpunkt des Todes bis auf 60 % des Ausgangswertes abgefallen. O. Wieland, Fischer und Reiter konnten für das langsamer wirkende Amanitin zeigen, dass das Leberglykogen bei Mäusen 8 bis 9 Stunden nach Giftinjektion auf

kaum meßbare Werte absinkt, und dass die Leber danach nicht mehr imstande ist, aus parenteral zugeführter Glukose Glykogen aufzubauen. Das gilt sowohl für das Ganztier (109) als auch für in vitro inkubierte Gewebeschnitte von den vergifteten Tieren (77).

Th. Wieland und Dose (113) beobachteten ferner bei Mäusen ein Absinken des Gehalts der Leber an Glutathion, Harnstoff, DPN, ATP sowie einen starken Abfall der Serumproteine (112) vor allem in der Albuminfraktion, der bei Injektion von 0,6 gamma/g Phalloidin bei Mäusen nach 24 Stunden, bei Ratten erst im Verlauf von Tagen deutlich wurde. Dieselbe Veränderung fand Matschinsky (54) an Mäusen bei Erhöhung der Phalloidindosis auf 4 gamma/g schon nach einer Stunde; er führte sie hier jedoch zumindest teilweise auf einen Albuminverlust ans Interstitium bei verstärkter Ausschwemmung von Globulinen aus den geschädigten Leberzellen zurück. Szabados (99) hat neuerdings bei Ratten mit chronischer Phalloidinvergiftung, die 8 bis 10 Phalloidininjektionen überstanden hatten, ebenfalls eine Erniedrigung des Albumins und eine Erhöhung der beta- und gamma-Globuline festgestellt. Ausgehend von diesen Beobachtungen stellten v. d. Decken, Loew und Hultin (20) bei phalloidinvergifteten Meerschweinchen und Mäusen eine starke Hemmung des Einbaus radioaktiv markierter Aminosäuren in Leberproteine fest, die nicht nur nach Giftinjektion in vivo an insoliierten Lebermikrosomen, sondern auch in vitro bei Inkubation von Leberschnitten mit Phalloidin in Konzentrationen von 3×10^{-6} - 10^{-5} M nachzuweisen war. Die Einbauhemmung war schon nach 1 Stunde deutlich, während die ebenfalls beobachteten Störungen der Mitochondrienfunktion wie Atmungskontrolle, P/O-Quotient und latente ATP-ase-Aktivität erst später zusammen mit der makroskopisch sichtbaren Leberschädigung auftraten.

Die durch das Phalloidin bewirkte Leberschädigung spiegelt sich auch in Veränderungen des Blutserums wieder. Matschinsky und O. Wieland (60) fanden im Serum mit 4 gamma/g vergifteter Kaninchen nach 5 Stunden einen erheblichen Anstieg von Bili-

rubin, anorganischem Phosphat, Tyrosin, Harnsäure und pentosehaltigen Purinabkömmlingen, ferner wies das Kaninchen im Gegensatz zur Ratte (54) einen Blutzuckeranstieg bis auf 700 mg % in 5 Stunden auf. Hinsichtlich des Verhaltens von Milchsäure und Brenztraubensäure liegen unterschiedliche Befunde vor. Th. Wieland und Dose (113) sahen bei Mäusen nach Phalloidininjektion ein Absinken des Lebergehalts an Lactat und Pyruvat. Dagegen wird nach O. Wieland (107) die Lactat- und Pyruvataufnahme durch inkubierte Leberschnitte von in vitro zugefügtem Phalloidin nicht beeinflusst. Auch Matschinsky (54) konnte bei Durchströmung der isolierten Meerschweinchenleber mit phalloidinhaltiger Ringerlösung keine Änderung der Milchsäureausscheidung beobachten, während nach einer älteren Arbeit (39) bei der isolierten Hundeleber nach Verfütterung von Knollenblätterpilzextrakt die Milchsäure im Lebergewebe und in der Durchströmungsflüssigkeit stark ansteigt.

Die Milchsäuredehydrogenase der Mäuseleber bleibt nach Matschinsky (54) bei Vergiftung mit 4 gamma/g Phalloidin ebenfalls in ihrer Aktivität unverändert. Bei anderen, gleichfalls im Zellplasma lokalisierten Leberenzymen (Glukose -6-Phosphatdehydrogenase, Hexokinase) fand sich schon eine Stunde nach Vergiftung der Leber eine leichte aber deutliche Aktivitätsminderung. Weitaus stärker war nach dieser Zeit die Aktivität der in den Mitochondrien lokalisierten Enzyme (Citrat-condensierendes Enzym, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und die Fettstoffwechselenzyme beta-Hydroxyacyldehydrogenase und beta-Ketothiolase) abgesunken. Entsprechende Serumveränderungen fanden Matschinsky und O. Wieland (60) bei mit 4 gamma/g Phalloidin vergifteten Kaninchen. Hier zeigte sich eine erhebliche Aktivitätsvermehrung von Enzymen mitochondrialer Herkunft; wie Citrat-condensierendes Enzym, SGOT, SGPT, beta-Ketothiolase, beta-Hydroxyacyldehydrogenase, sowie von anderen, normalerweise nicht im Serum nachweisbaren Enzymen, wie der Glycerokinase.

Die erheblich eingeschränkte Fähigkeit der phalloidin-vergifteten Leber, energiereiche Verbindungen aufzubauen, ließ an eine Giftwirkung auf die energieliefernden Prozesse des Zellstoffwechsels denken. Wie bereits erwähnt, fanden Th. Wieland und Dose (113) an Lebermitochondrien phalloidinvergifteter Ratten nach 6 Stunden einen starken Abfall von ATP mit gleichzeitiger Abnahme des ATP/ADP-Quotienten auf Werte unter 1. Der P/O-Quotient blieb jedoch ebenso wie bei anderen Untersuchern (O. Wieland) (107, 114), v. d. Decken et al (20) lange Zeit unverändert und sank erst im Endstadium der Vergiftung ab, erholte sich jedoch sofort wieder nach Zugabe von ADP und ATP. Somit schien eine Störung des Energiestoffwechsels auf Grund erhöhten Zerfalls energiereicher Phosphate vorzuliegen, zumal sich im Serum keine Spur von ATP, ADP, oder DPN, dafür aber ein Anstieg ihrer Spaltprodukte wie anorganisches Phosphat, Harnsäure u. a. finden ließ (60). Tatsächlich sahen Matschinsky und O. Wieland (60) an Lebermitochondrien von mit 2 mg/kg Phalloidin vergifteten Ratten eine Aktivierung der Mg^{++} abhängigen Adenosintriphosphatase um mehr als 200%. Die Enzymaktivität wurde durch Glutaminat und Succinat stark herabgesetzt. Diese Substanzen waren auch bei den weiter oben beschriebenen Versuchen (107, 113, 114) zugesetzt worden, was vielleicht eine Erklärung dafür bietet, dass dort keine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung beobachtet werden konnte. Durch nachträglich in vitro zugesetztes Phalloidin ließ sich keine der beschriebenen Veränderungen erzeugen. Demgegenüber fand Hess eine 99%ige Hemmung der oxydativen Phosphorylierung auf der Cytochromstufe bei in vitro mit einer Phalloidinkonzentration von $10^{-4}M$ inkubierten Rattenlebermitochondrien, die allerdings mit Digitonin verbehandelt waren (36).

Die bisher angeführten Untersuchungen konzentrierten sich auf die Leber als den schon vom klinischen Bild her wahrscheinlichen Hauptort der Giftwirkung. Andere Wege gingen Verne, Ceccaldi und Hebert (103), die an Ratten durch Her-

vorrufung eines künstlichen Diabetes mit Alloxan eine Schutzwirkung vor sonst tödlichen Dosen von Knollenblätterpilzextrakt erzeugen konnten, wobei der infolge des Diabetes erhöhte Blutzuckerspiegel auf dauernd normale Werte zurückging. Auf Grund histologischer Untersuchungen der Pankreasinseln (102) gelangten die genannten Autoren zu der Vorstellung, dass eine durch die Amanitatoxine bewirkte Atrophie der alpha-Zellen bei gleichzeitiger beta-Zellhyperplasie für die bei der Pilzvergiftung bekannte Hypoglykämie verantwortlich sei. Umgekehrt soll das Alloxan durch die Schädigung der beta-Zellen den durch Ausfall der alpha-Zellen bedingten Glukagonmangel kompensieren. Matschinsky (54) konnte bei Wiederholung der Versuche mit reinem Phalloidin die beschriebene Schutzwirkung ebenfalls erzeugen, jedoch stellte sich nach kurzer Zeit der Alloxandiabetes wieder voll ein, was gegen eine phalloidinbedingte alpha-Zellschädigung spricht. Demnach dürfte die Schutzwirkung des Alloxans eher auf einer durch den Diabetes bewirkten Änderung der Permeabilitätsverhältnisse, vielleicht auch auf einer Aktivitätssteigerung von Enzymen des Kohlehydrat-, Eiweiß-, und Fettstoffwechsels beruhen (46, 110). Histologische Untersuchungen der Pankreasinseln nach Vergiftung mit alpha-Amanitin ergaben jedenfalls keinen Anhalt für eine alpha-Zellschädigung (93).

Eine einleuchtende Erklärung für die beschriebene Wirkung des Alloxans ergibt sich an Hand der zuerst von v. d. Decken et al. (20) ausgesprochenen Vermutung, daß das Phalloidin als solches noch nicht wirksam ist, sondern durch bestimmte hauptsächlich in der Leber vorhandene Enzyme erst zu einer toxischen Substanz umgewandelt wird. Diese Annahme ist inzwischen durch verschiedene experimentelle Befunde erhärtet worden (25, 26, 99, 111), wie später im einzelnen gezeigt werden soll. Da Alloxan die Aktivität dieser "drug-metabolizing enzymes" hemmt (22), läßt sich seine schützende Wirkung bei der Phalloidinvergiftung dadurch erklären, dass die Umwandlung des Phalloidins in das wirksame Reaktionsprodukt unterbunden wird.

Cova (18) sieht die Ursache für die bei Knollenblätterpilzvergiftung zu beobachtenden Hypoglykämie in einem Hyperinsulinismus, den er auf eine von ihm in der Leber vergifteter Ratten festgestellte Senkung der Insulinaseaktivität zurückführt. Matschinsky (54) weist jedoch darauf hin, dass die Insulinase schon durch recht unspezifische Einflüsse, z. B. Hunger, eine starke Aktivitätsminderung erfährt (11), und dass sie nicht als einziges, sondern nur als eines unter vielen anderen Enzymen durch das Phalloidin beeinträchtigt wird.

Aus dem Gesagten geht hervor, dass das Phalloidin eine Vielzahl von Stoffwechselveränderungen hervorruft, die sich nur schwer in ein zusammenhängendes Bild einordnen lassen. Eine Aussage über den primären Wirkungsort des Giftes scheitert vor allem an der Unmöglichkeit, die zeitliche Reihenfolge der Erscheinungen festzulegen, die unter den verschiedensten Versuchsbedingungen hinsichtlich Art und Zuchtstamm der Versuchstiere, Menge und Verabreichungsweise des Giftes, Gewinnung des Untersuchungsmaterials u. a. beobachtet wurden. Wir wählten deshalb für unsere Versuche die Methode der Perfusion der isolierten Leber. Sie bietet die Möglichkeit, das Organ direkt zu beobachten, wobei sich in beliebig rascher Folge sowohl vom Lebergewebe als auch aus dem Perfusionsmedium Proben entnehmen lassen. Die so gewonnenen Stoffwechselprofile bieten ein viel höheres Maß an Genauigkeit, zumal auch die durch Verwendung mehrerer, zu verschiedenen Zeiten getöteter Versuchstiere bedingte Streuung fortfällt. Ausserdem lässt sich so die Frage klären, ob das Phalloidin direkt oder erst nach vorheriger Körperpassage, bzw. auf dem Umweg über eine Störung der Regulationssysteme des Organismus auf die Leber wirkt.

Die in der durchströmten Leber herrschenden Stoffwechselverhältnisse lassen sich sehr wohl mit denen des Ganztieres vergleichen. Das lässt sich für den Energiestoffwechsel durch die Messung des ADP/ATP-Quotienten zeigen, der mit 3,48 dem für das Ganztier bekanntem Wert ent-

spricht (58). Schimassek hat inzwischen diesen Befund bestätigt und ferner gefunden, dass die Quotienten verschiedener sehr empfindlicher Redoxsysteme im Stoffwechsel der durchströmten Leber (Lactat/Pyruvat, Glycerol-1-P/ Dihydroxyaceton-P, Malat/Oxalacetat) nach kurzer, durch die Operation bedingter Anaerobiose schon nach 30 Minuten wieder den am Ganztier gemessenen Werten entsprechen (88).

Das Ziel unserer Versuche war zunächst, die Wirkung des Phalloidins auf den Kohlehydratstoffwechsel der Leber näher zu analysieren. Beim Durchströmungsversuch verfolgten wir das Verhalten des Leberglykogens sowie des Glukose- und des Milchsäurespiegels im Perfusat. Daneben maßen wir auch in vitro die Glykogenolyse mit Phalloidin inkubierter Leberschnitte. In beiden Fällen verglichen wir die Phalloidinwirkung mit der des Glukagons, dessen glykogenolytische Wirkung auf einer Erhöhung der Phosphorylaseaktivität beruht (98). Als Maß für die Atmungsintensität der isolierten Rattenleber bestimmten wir die CO_2 -Bildung in der Erwartung, dass eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung, wie sie nach Hess durch das Phalloidin bewirkt werden soll (35), sich durch eine Steigerung der Zellatmung bemerkbar machen müßte. Zum Vergleich dienten Versuche mit 2,4-Dinitrophenol, für das eine entkoppelnde Wirkung mit Sicherheit bekannt ist (31). Einige Versuche wurden auch mit Schilddrüsenhormonen durchgeführt, deren Wirkung nach verschiedenen Autoren (36, 46, 52, 53) ebenfalls auf einer Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung beruhen soll. Wir beobachteten ferner den Harnsäurespiegel sowohl im Serum des Ganztiers als auch im Medium beim Durchströmungsversuch. Schliesslich verfolgten wir anhand von Serien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Vergiftung hergestellter mikroskopischer Präparate den Ablauf der durch das Phalloidin an der durchströmten Rattenleber hervorgerufenen histologischen Veränderungen.

Für die Überlassung des Themas sowie für Anregung und Leitung bei den Versuchen bin ich Herrn Professor Dr. O. Wieland, Leiter des Laboratoriums für Klinische Chemie der II. Medizinischen Klinik der Universität München zu großem Dank verpflichtet, Ferner gebührt mein Dank Herrn Dr. F. Matschinsky für wertvolle Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik. Ich danke auch Herrn Professor Dr. A. Georgii vom Pathologischen Institut der Universität München für die Möglichkeit, mich dort in der Anfertigung histologischer Präparate zu üben, sowie für die Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Präparate. Das bei der Untersuchung verwendete Phalloidin wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Th. Wieland von der Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt, desgleichen Glukagon und glukagonfreies Insulin von Herrn Dr. Weinges und Corticosteron von Herrn Priv.Do. Dr. Schwarz, beide von der II. Medizinischen Universitätsklinik München. Schliesslich habe ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Gewährung einer Unterhaltsbeihilfe während der Durchführung der Versuche zu danken.

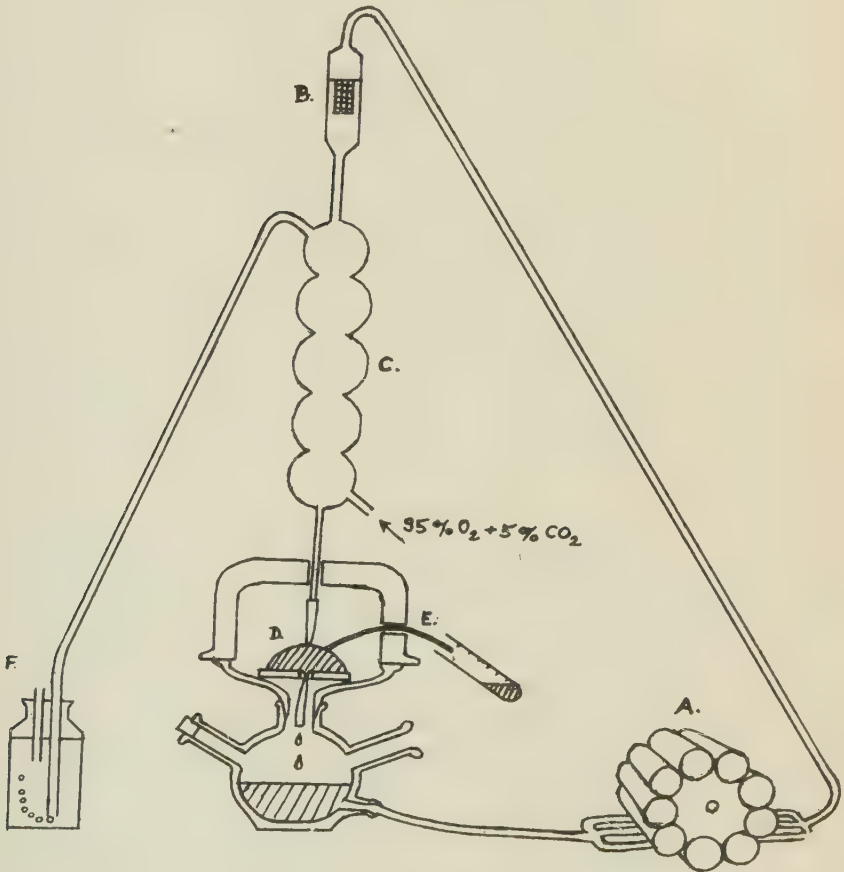
Methodik

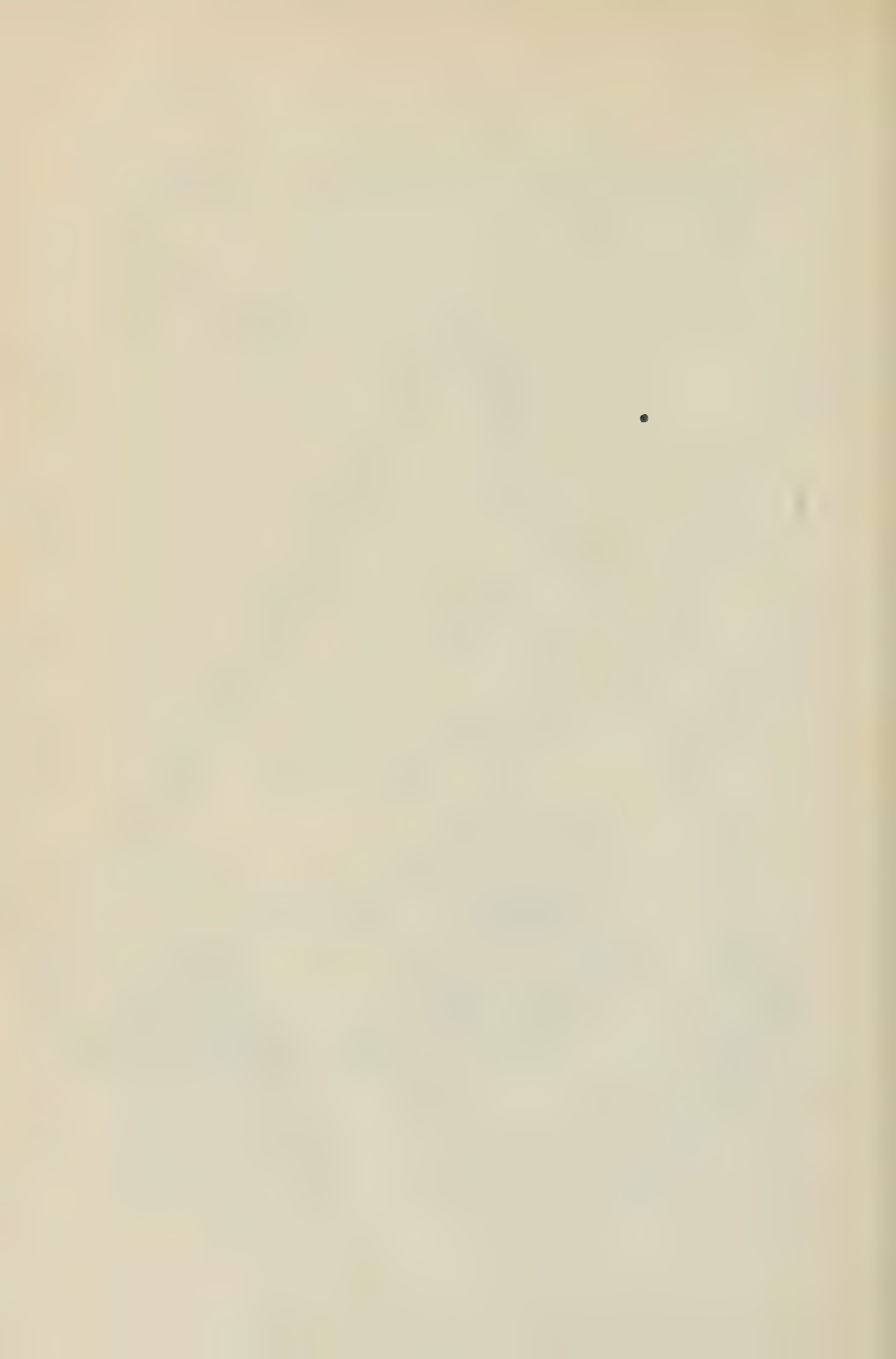
Durchströmung der isolierten Rattenleber

Die Leberperfusion wurde nach der von Miller et al. (61) und Brauer et al. (10) angegebenen, von Schimassek (87) und von uns weiter entwickelten Methodik durchgeführt (Abb.:1). Die Durchströmungseinrichtung ist in einer Kunststoffkammer aufgebaut, in der die Temperatur durch einen Thermostaten auf 37°C gehalten wird. Die Durchströmungsflüssigkeit wird durch eine elektrisch betriebene Rollenpumpe (A) in einem Kreislaufsystem aus Silicon-Schläuchen umgetrieben. Nachdem

Abb. 1

Versuchseinrichtung zur Durchströmung der isolierten
Rattenleber (Erklärung im Text).





sie zur Entfernung etwaiger Gerinnsel zwei der bei Bluttransfusionen verwendeten, mit feinen Kunststoffsieben versehenen Tropfgefäße (B) passiert hat, gelangt sie in eine künstliche Lunge aus Glas (c), wo sie im Gegenstromprinzip einem Gemisch von 95 % O₂ und 5 % CO₂ ausgesetzt wird. Von dort tritt sie durch eine in die Vena portae eingebundene Polyäthylenkanüle in die Leber (D) ein, die mit der Facies diaphragmatica nach unten in einem Glasgefäß liegt. Dessen Deckel ist zweigeteilt und zur Hälfte abnehmbar, um während der Durchströmung die zur Gewinnung von Gewebeproben notwendigen Manipulationen zu ermöglichen. Ein Ansatzstutzen dient der Ableitung der Galle durch eine in den Gallengang eingebundene dünne Polyäthylenkanüle (E). Das Perfusat verläßt die Leber durch eine in die Vena cava superior eingebundene Polyäthylenkanüle und sammelt sich am Boden des Glasgefäßes, das zur Entnahme von Flüssigkeitsproben mit Schliffstützen versehen ist. Durch einen weiteren Ansatzstutzen fließt das Perfusat in das Zirkulationssystem ab.

Sämtliche Glasteile lagen zwischen den Versuchen in Bichromatschwefelsäure und wurden erst vor Gebrauch herausgenommen und mit Wasser und physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Siliconschläuche und Polyäthylenkanülen wurden in einer Bikarbonat-Formalinlösung aufbewahrt. Bei den Durchströmungsversuchen zeigte sich, das selbst kleinste an den Wänden der Schläuche zurückbleibende Blutreste, sei es durch Bakterienwachstum, sei es durch eine spezifische Wirkung des denaturierten Bluteiweißes, die Leberdurchblutung stark beeinträchtigten. Die Siliconschläuche wurden daher durch mehrmaliges Hinzuziehen einer an einem Draht befestigten Reagenzglasbürste gereinigt und anschliessend mit Wasser und physiologischer Kochsalzlösung durchgespült.

Da die Gewinnung von Rattenblut in ausreichender Menge schwierig und kostspielig gewesen wäre, verwendeten wir als Durchströmungsflüssigkeit eine Aufschwemmung von Rindererythrozyten in Tyrodelösung. Rindererythrozyten eignen sich besonders gut für Durchströmungsversuche, weil sie langsam sedimentieren und nicht zur Geldrollenbildung neigen, ausserdem ist ihr Durchmesser etwas kleiner als der von Rattenerythozyten (88). Das Rinderblut wurde jeweils am Versuchstage im Schlachthof aus der Jugularvene eines eben getöteten Rindes in einem Gefäß aufgefangen, das mit der bei Blutkonserven verwendeten Lösung aus 2,16 % Natriumcitrat, 2,34 % Zitronensäure und 0,5 % Glukose beschickt war. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert, dreimal mit Tyrodelösung gewaschen und in Tyrodelösung bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 70 % nach Sahli aufgeschwemmt. Von dieser Suspension wurden 100 ml unter Hinzufügung von 2 g% Rinderalbumin (reinst, Behringwerke) als Kolloid-osmotischem Anteil und 5 mg% Aureomycin sowie der jeweils gewünschten Glukosemenge zum Versuch verwendet. Bei den Glykogensyntheseversuchen wurden noch verschiedene Aminosäuren gemäß dem im Rattenblut vorliegenden Mengenverhältnissen hinzugefügt (101): (Angaben in mg/100 ml) Arginin 2,6, Histidin 0,6, Isoleucin 1,0, Leucin 1,9, Lysin 3,5, Methionin 0,9, Phenylalanin 0,9, Prolin 2,7, Threonin 4,3, Tyrosin 1,8, Valin 2,1.

Die Präparation der Leber wurde in Aethernarkose vorgenommen. Diese wurde in einer mit einem aethergetränkten Wattebausch beschickten Glasglocke eingeleitet und als Aethertropfnarkose fortgesetzt, wobei eine kegelförmige, dem ganzen Kopf des Tieres bedeckende Narkosemaske verwendet wurde. Die Leibeshöhle wurde durch Mittelbauchschnitt eröffnet und die Leberpforte durch Beiseiteschieben der Darmschlingen dargestellt. Um den Gallengang und die Vena cava wurde durch vorsichtiges Unterstechen mit einer chirurgischen Nadel je eine lose Ligatur gelegt.

Hierauf wurde zunächst der Gallengang durch einen vorsichtigen Scherenschlag eröffnet und die Gallenkanüle eingeführt und durch die Ligatur fixiert. Dann wurde auf die gleiche Weise die Pfortaderkanüle eingebunden. Von diesem Augenblick an ist die Blutzufuhr der Leber unterbrochen, die weiteren Schritte müssen also möglichst rasch erfolgen. Nach Eröffnung des Brustraums mit der Schere wurde um die Vena cava superior eine Ligatur gelegt, die Abflusskanüle wurde durch einen Einschnitt in die Vene eingeführt und eingebunden. Dann wurde das Leberpräparat durch einige Scherenschläge exstirpiert, gewogen und auf einem kleinen Plastikteller so in das Lebergefäß eingelegt, dass die Pfortaderkanüle an den von der Glaslunge kommenden Schlauch angeschlossen werden konnte und die Abflusskanüle durch eine zentrale Öffnung im Plastikteller nach unten hing. Die Gallenkanüle wurde durch den Ansatzstutzen am Glasgefäß nach aussen geführt und zum Auffangen der Galle ein graduiertes Röhrchen vorgelegt.

Versuchstiere

Wir verwendeten männliche Albinoratten aus der Zucht von Herrn Willi Gassner, München-Ottobrunn, die zur Erreichung möglichst konstanter Versuchsbedingungen mit dem Standardfutter Altromin R der Firma Altrogge, Lage/Lippe, ernährt wurden.

Gewinnung und Verarbeitung der Lebergewebsproben.

Die zur Substratbestimmung verwendeten Leberproben wurden mittels des Frierstopp-Verfahrens gewonnen. Hierzu wurde jeweils ein kleinerer oder ein Teil eines grösseren Leberlappens nach Anlegen einer Seidenligatur mit einer zuvor in flüssige Luft eingetauchten Zange gefasst, deren

Branchen in ca. 2 x 3 cm messenden Aluminiumplatten endeten. Das eingefrorene Gewebe wurde mit der Schere abgetrennt und von nicht vollständig durchgefrorenen Anteilen befreit, dann bis zum weiteren Aufschluss in einem Gefäß mit flüssiger Luft aufbewahrt. Die zur histologischen Untersuchung bestimmten Leberproben wurden ebenfalls abgebunden, durch einen Scherenschlag abgetrennt und in 5%igem Formalin fixiert. Die mikroskopischen Präparate wurden nach dem Gefrierschnittverfahren hergestellt und teils mit Hämalaun-Eosin, teils zum Fettnachweis mit kolloidaler Sudanlösung nach Romeis gefärbt (85).

Messung der Glykogenolyse inkubierter Leberschnitt

Bei den Inkubationsversuchen wurde im wesentlichen nach den Angaben von Warburg (106) und Sutherland et al. (98) vorgegangen. Um zur Steigerung der Glykogenolysebereitschaft ein möglichst hohen Anfangsgehalt der Rattenleber an Glykogen zu erreichen, wurden vor dem Versuch 20 ml 20 % Fruktose intraperitoneal injiziert. Zur Vermeidung eines durch die peritoneale Reizung bedingten, mit Ausschüttung der Glykogenreserven einhergehenden Schocks wurde das Tier vorher mit Nembutal narkotisiert. 45 Minuten nach der Fruktoseinjektion wurde die Leber extirpiert und in eisgekühlter Sucroselösung vorgekühlt. Ein quadratisch zugeschnittenes Leberstück wurde auf dem Deckel einer eisgefüllten Petrischale gelagert und durch leichten Druck auf einen darübergerlegten Objektträger fixiert. Die mit einer dünnen Rasierklinge angefertigten Leberschnitte wurden rasch in Portionen zu 70-130 mg abgewogen und in 1,6 ml Krebs-Henseleit-Lösung (44) bei 37°C 60 Minuten lang inkubiert. Nach dieser Zeit wurden jeweils 0,05 ml Suspensionsmedium abpipettiert und nach Zusatz von 0,5 ml Perchlorsäure und 0,45 ml Kaliumfluorid zur enzymatischen Glukosebestimmung verwendet.

Messung der CO₂-Bildung der durchströmten Rattenleber.

Zur CO₂-Bestimmung im Perfusionssystem wurde das aus der künstlichen Lunge austretende Gasgemisch durch eine Vorlage mit Bariumhydroxyd (F) geleitet (s. Abb. 1). Das ausfallende Bariumkarbonat wurde in halbstündlichen Abständen im Saugfilter abgenutscht und an der Luft bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Durch stöchiometrische Umrechnung ergibt sich aus dem Trockengewicht des in 1 Stunde ausgefallenen BaCO₃ die in dieser Zeit von der Leber erzeugte CO₂-Menge. Der QCO₂ der durchströmten Rattenleber errechnet sich nach

$$\frac{\mu\text{l CO}_2}{\text{Lebertrockengewicht in mg}}$$

Substratbestimmungen

Glukose. Die Glukose wurde enzymatisch nach der Glukoseoxydase-Methode bestimmt. Dabei bewirkt die Oxydation von Glukose zu Glukonsäure durch das Enzym Glukoseoxydase in Verbindung mit einer Peroxydase eine Entfärbung von Dianisidin. Die resultierende Extinktionsabnahme wird im Photometer der Fa. Eppendorf bei einer Wellenlänge von 436 mμ gemessen (9).

Glykogen. Zur Glykogenbestimmung wurden die Lebergewebsproben nach der durch Sahyun (86, 87) modifizierten Methode von Good, Kramer und Somogyi (32) aufgeschlossen. Dabei wird nach Zersetzung des Lebergewebes in kochender 30% KOH das Glykogen mit 95 % Alkohol gefällt und nach Abfiltrieren und Trocknen des Niederschlages mit 5n H₂SO₄ zu Glukose hydrolysiert. Diese wurde dann ebenfalls enzymatisch bestimmt (9).

Milchsäure. Die Lactatbestimmung erfolgte enzymatisch nach O. Wieland (108) mit DPN-unabhängiger Lactatdehydrogenase aus Hefe, wobei die Milchsäure durch das Enzym zu Brenztraubensäure dehydriert wird. Gemessen wird die durch Entfärbung des als Wasserstoffakzeptor dienenden Kaliumferrizyanids bedingte Extinktionsabnahme bei 405 μ . Das Enzym wurde nach der durch O. Wieland (108) modifizierten Methode von Dixon (21) aus Oberkoltzauer Bäckerhefe (Bezugsquelle: Hefegrosshandlung H. Mayr, München) gewonnen. Vergleichende Bestimmungen nach dieser Methode und mit DPN-abhängiger Lactatdehydrogenase nach Pfeleiderer und Dose (69) ergaben eine gute Übereinstimmung der Milchsäurewerte.

Harnsäure. Die Harnsäure wurde enzymatisch nach Kalckar (40) bestimmt. Die infolge der Oxydation von Harnsäure zu Allantoin durch das Ferment Uricase im ultravioletten Bereich auftretende Extinktionsänderung wurde bei einer Wellenlänge von 280 μ gemessen. Das zur Harnsäurebestimmung verwendete Blut wurde aus der Schwanzvene der vergifteten Tiere entnommen. Infolge der durch die Kreislaufwirkung des Phalloidins bedingten mangelhaften Gefässfüllung liessen sich meist nur sehr kleine Blutmengen gewinnen, deren genaue Abmessung schwierig war. Wir fertigten dazu eine Spezialpipette an, indem wir bei einer 1 ml-Laboratoriumspipette nach Zuschmelzen der Spitze durch Blasen über dem Bunsenbrenner eine umschriebene Erweiterung von ca. 0,7 ml Inhalt herstellten, etwa nach Art der in der klinischen Hämatologie verwendeten Pipetten. Durch Ausziehen über der Flamme und Abbrechen wurde anschliessend eine neue Pipettenspitze hergestellt. Die Eichung erfolgte durch Füllen mit Wasser und Abwiegen. Für die Bestimmung wurden zunächst 0,1 ml Blut aus der Schwanzvene aufgezogen, dann wurde die Pipette bis zur Eichmarke mit Aqua dest. aufgefüllt entsprechend einer Verdünnung von 1 : 7. Hier- von wurden 0,3 ml zur Harnsäurebestimmung nach Kalckar verwendet.

Ergebnisse.

Die morphologischen Veränderungen der isolierten Rattenleber unter dem Einfluss von Phalloidin.

Bei einwandfreien Versuchsbedingungen stellte sich spätestens nach wenigen Minuten eine optimale Durchblutung der isolierten Leber mit gleichmässig hellroter Färbung des Organs und einer Tropfgeschwindigkeit von 100 - 160/min. aus der Cava-Kanüle ein. Diesem Bilde entsprachen als Zeichen eines normalen Leberstoffwechsels ein kontinuierlicher Gallefluss, ein normaler ATP/ADP Quotient (58) und ein konstanter oder ansteigender Gehalt an Leberglykogen. Während jedoch die Leber oft bis zu 8 Stunden äußerlich unverändert blieb, wies bei manchen Versuchen nach 5 bis 6 Stunden eine erhöhte Glukose-Ausschüttung ins Perfusionsmedium auf eine beginnende Stoffwechselentgleisung hin.

Bei den Vergiftungsversuchen kam es wenige Minuten nach Zusatz von Phalloidin zum Perfusionsmedium zu dem von Matschinsky (57) beschriebenen völligen Versiegen des Galleflusses. Die Erscheinung zeigte keine Abhängigkeit von der Giftdosis und trat schon bei Zusatz von 0,125 mg Phalloidin zum Medium schlagartig ein. Nach 1 bis 5 Stunden, und zwar offenbar in Abhängigkeit von der Phalloidin-Dosis entwickelte sich eine teils erhebliche Lebervergrößerung mit Anstieg des Organgewichts, zunehmend spröder und brüchiger Konsistenz und Verfärbung von hell-über dunkelrot zu schwarzrot.

Im mikroskopischen Präparat (Interpretation durch Herrn Prof. Dr. A. Georgii) zeigte sich schon 1/2 Stunde nach Vergiftung mit 1×10^{-4} M Phalloidin, also vor dem Eintritt makroskopischer Organveränderungen, eine großvakuoläre Auflockerung des Zytoplasmas der Leberzellen vorwiegend in der Läppchenperipherie. In den mäßig er-

weiterten Kapillaren fanden sich auffallend viele segmentkernige Leukozyten und vereinzelt fibrinoide Mikrothromben.

Nach 1 Stunde war die Veränderung graduell stärker. Vakuolisierte Zellen fanden sich nun auch in den Läppchen-Zentren, stets war jedoch bereits die Intermediärzone einbezogen.

Nach 1 1/2 Stunden traten erstmals deutliche Blutungs-herde in der Läppchen-Peripherie anstelle untergegangener Leberparenchymzellen auf, nunmehr zeigten sich auch vereinzelte Parenchymzellnekrosen der Läppchen-Zentren mit Schwund der Zellkerne.

Nach 2 1/2 Stunden fand sich ein graduell fortschreitender Befund mit teilweise schon die Zentralvene erreichenden Blutungen. Sämtliche Präparate zeigten die anfangs erwähnten Mikrothromben mit Vermehrung der segmentkernigen Leukozyten auf den Kapillarquerschnitten.

Die Fettfärbung mit Sudan nach Romeis ergab zu allen Versuchszeiten praktisch fettlose Leberschnitte.

Glykogensynthese der isolierten Rattenleber

Um für die Syntheseveruche das Leberglykogen auf einen niedrigen Ausgangswert zu bringen, ließen wir die Versuchstiere 20 Stunden lang hungern. Zur Gewährleistung ausreichender Proteinreserven in der Leber während der Durchströmung, nicht zuletzt im Hinblick auf die Möglichkeit einer Glukoneogenese aus Eiweiß (1,50), fügten wir dem Perfusionsmedium das früher angegebene Aminosäurengemisch (101) hinzu. Bei den Versuchen zeigte sich, dass die Glykogensynthese nur bei hohem Glukoseangebot im Perfusionsmedium in nennenswertem Umfang vor sich geht. Während bei einem Glukosespiegel von 100 mg/% nur

geringe Glykogenmengen aufgebaut wurden, stieg bei einer Glukosekonzentration von 400 mg% der Leberglykogengehalt sofort nach Versuchsbeginn steil an, um nach 3 bis 6 Stunden wieder abzusinken (Abb. 2).

Da nach Sutherland und Cori (97, 98) unter den zwischen Glykogen und Glukose vermittelnden Enzymreaktionen das durch das Phosphorylasesystem katalysierte Gleichgewicht zwischen Glykogen und anorganischem Phosphat einerseits, Glukose-1-Phosphat andererseits, eine limitierende Rolle zu spielen scheint, verabreichten wir bei einigen Versuchen Glukose-1-Phosphat als Substrat, um das Gleichgewicht in Richtung des Glykogens zu verschieben. Bei Zusatz von Glukose-1-Phosphat in einer Konzentration von 500 mg% fand keinerlei Glykogensynthese in der Leber statt. Man hatte den Eindruck, dass das im Perfusionsmedium angebotene Glukose-1-Phosphat von der intakten Leberzelle gar nicht aufgenommen wird. Die erwähnten Versuche von Sutherland und Cori waren an inkubierten Leberschnitten durchgeführt worden.

Zugabe von Phalloidin zur Durchströmungsflüssigkeit bewirkte eine deutliche Hemmung der Glykogensynthese in der Leber. Dabei zeigten das Ausmaß der Synthesehemmung und vor allem der Zeitpunkt ihres Eintritts eine klare Abhängigkeit von der Giftdosis (Abb. 2).

Bei Vergiftung mit 1 oder 2 mg% Phalloidin war jede Synthesetätigkeit von Anfang an aufgehoben. 0,5 und 0,25 mg% zeigten eine deutliche aber verzögerte Wirkung, die erst etwa 1 1/2 Stunden nach Vergiftung sichtbar wurde, während 0,125 mg% keinen sicheren Einfluss mehr erkennen ließen. Die niedrigen Synthesewerte des einen der zwei in Abb. 2 dargestellten Versuche mit 0,125 mg Phalloidin dürften nach dem Kurvenverlauf nicht auf einer Giftwirkung beruhen, das Bild entspricht eher einer von vornherein schwächeren Synthesetätigkeit mit dem auch bei den Normalversuchen erkennbaren terminalen Glykogenabfall.

Dieser Abfall beruhte mit Sicherheit nicht auf dem Absinken des Glukoseangebots im Perfusionsmedium, da er auch dann auftrat, wenn der Anfangsspiegel von 400 mg% durch laufende Glukosezufuhr von 60 mg%/h konstant gehalten wurde. Im Hinblick auf die seit längerer Zeit bekannte fördernde Wirkung der Nebennierenrindenhormone auf die Glykogenspeicherung im Organismus (50) war eine Erklärungsmöglichkeit darin zu suchen, dass die Glukocorticoide des Lebergewebes sich im Laufe des Versuchs verbrauchen und darauf hin die Syntheseleistung für Glykogen wieder absinkt. In diese Richtung wiesen gleichzeitig im hiesigen Laboratorium durchgeführte Bestimmungen des Corticosterongehalts der isolierten Rattenleber (58), wonach der Hormonspiegel nach spätestens 4 Stunden auf minimale Werte abgesunken ist. Dabei war auch Aufschluss über die Frage zu erwarten, ob die Glukocorticoidwirkung unmittelbar an der Leber ansetzt oder ob es sich um Regulationsvorgänge im Rahmen des Gesamtstoffwechsels handelt. Auf die erstere Möglichkeit wiesen Versuche von Seckel (91) hin, der die Glykogenolyse inkubierter Leberschnitte durch in vitro zugesetztes Nebennierenrindenhormon hemmen konnte.

Wie die Abbildung 3 zeigt, ergaben unsere Versuche eine deutliche Hormonwirkung auf die isolierte Rattenleber. Bei laufender Zufuhr von Corticosteron zum Perfusionsmedium in einer Dosierung von 50 gamma/h deckt sich die Mittelwertskurve der Versuche eine Zeitlang fast genau mit derjenigen der Normalversuche. Wie bei diesen begannen die Glykogenwerte nach 3 bis 4 Stunden abzusinken, um jedoch dann wieder scharf anzusteigen und bis zum Ende des Versuchs sehr hohe Werte zu erreichen. Offenbar setzte die Glukocorticoidwirkung erst nach einer Latenzzeit von 4 bis 5 Stunden ein. Diese entspricht ziemlich genau der von Hyde (38) am Ganztier beobachteten Ver-

Abb. 2

Die Glykogensynthese in der isolierten Rattenleber nach 20stündigem Hungern, ● bei Zusatz von Phalloidin zu Versuchsbeginn, wobei die jeweilige Phalloidindosis am Ende der Kurven angegeben ist, und ○ im Kontrollversuch. Dargestellt ist der Glykogengehalt in mg pro g Lebergewebe. Anfangsspiegel der Glukose in der Durchströmungsflüssigkeit: 400 mg%, zusätzlich Infusion von 60 mg/h.

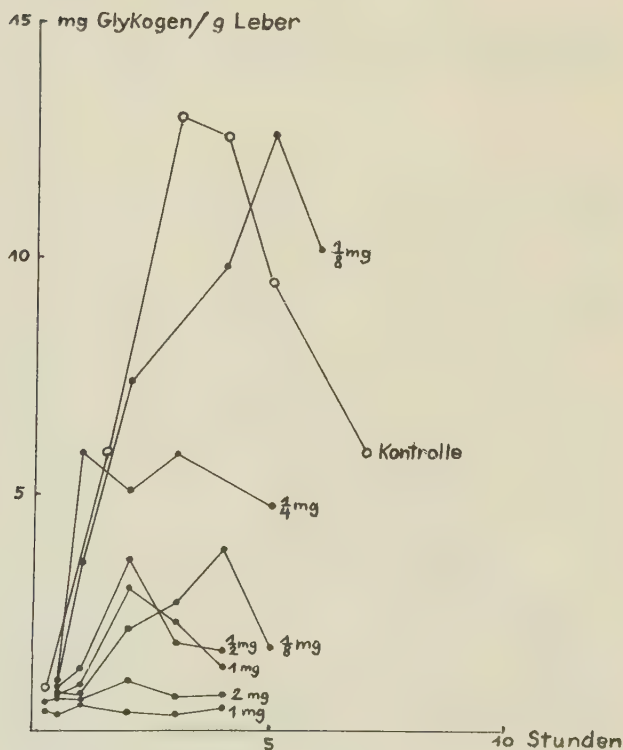
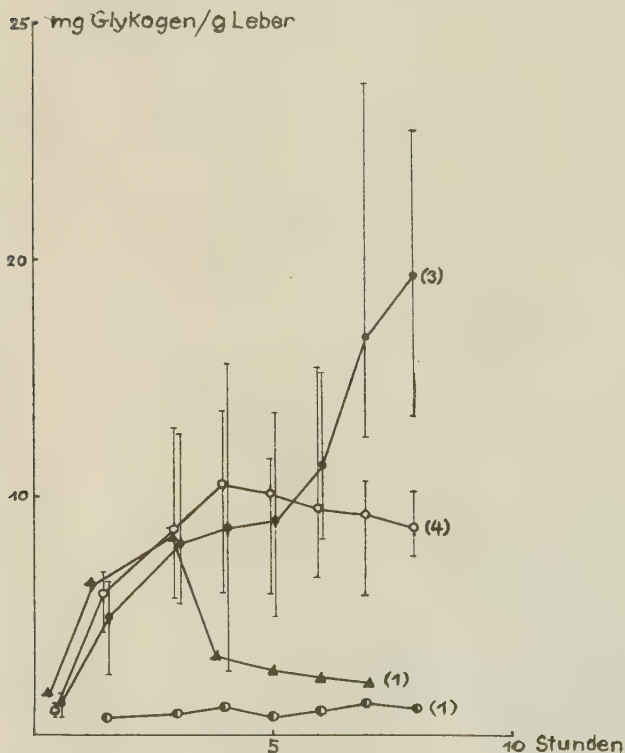


Abb. 3

Die Glykogensynthese in der isolierten Rattenleber nach 20stündigem Hungern, ● nach Zusatz von 50% Corticosteron zu Versuchsbeginn, ○ im Kontrollversuch. Dargestellt sind die Mittelwertskurven aus mehreren Einzelversuchen, deren Anzahl am Kurvenende in Klammern angegeben ist. Die senkrechten Linien geben die Streubreite der Glykogenwerte zum jeweiligen Zeitpunkt wieder. Bei dem Corticosteronversuch ▲ wurden nach 3 Stunden 0,25 mg% Phalloidin zugesetzt. Anfangsspiegel der Glukose in der Durchströmungsflüssigkeit: 400 mg%, zusätzlich Infusion von 60 mg/h. Der Corticosteronversuch ● wurde bei niedriger Glukoseanfangskonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit (100 mg%) ohne zusätzliche Glukoseinfusion durchgeführt. Dargestellt ist der Glykogengehalt in mg pro g Lebergewebe.



zögerung der glykogenspeichernden Wirkung von Hydrocortison um 3 bis 4 Stunden. Hübener et al. geben für die Cortisonwirkung am Ganztier eine Latenzzeit von mindestens 1 bis 2 Stunden an, (37) wobei auch hier die stärkste Glykogenzunahme erst nach 3 bis 6 Stunden einsetzte (19). Andere Untersucher fanden einen sofortigen Wirkungseintritt von Nebennierenextrakten an Leberschnitten und im Perfusionsversuch (13,66). Da diese Versuche jedoch bei sehr hohem Glukose- und Hormonangebot durchgeführt wurden, lassen sie sich mit den unseren schlecht vergleichen.

Nach neueren Ergebnissen wirken die Nebennierenrindenhormone direkt auf die Synthese von Glukose und Glykogen aus Eiweiß (37). Unsere Versuche sprechen dafür, dass sie auch die Synthese von Glykogen aus Glukose fördern, da die Glukoneogenese aus Eiweiß dabei nur eine geringe Rolle gespielt haben kann. Dies zeigt ein ohne dauernde Glukosezufuhr durchgeführter Perfusionsversuch (Abb.3), bei dem auch unter dem Einfluss von Corticosteron fast kein Glykogen in der Leber gespeichert wurde, obwohl das früher angeführte Aminosäurengemisch (101) dem Perfusat hinzugefügt wurde. Somit kann bei den Versuchen mit ständiger Zufuhr von Glukose das neugebildete Leberglykogen nur aus dieser aufgebaut worden sein. Es ist gezeigt worden, dass die Nebennierenrindenhormone aktivierend auf einige Enzyme der Glukoneogenese aus Eiweiß wirken (15,18,37). Civen und Knox (15) möchten diese Ergebnisse verallgemeinern und diskutieren die Möglichkeit, dass der Mechanismus der Hormonwirkung überhaupt in einer Aktivierung von Enzymen besteht. Untersuchungen anderer Hormone, etwa des Glukagons, sprechen für die Richtigkeit dieser Vorstellung (74,97,98). Hier nach lassen unsere Versuche auch eine Wirkung des Corticosterons auf Enzyme der Glykogensynthese aus Glukose annehmen (58.).

Bei der Therapie der Knollenblätterpilzvergiftung die Zufuhr von Nebennierenrindenhormonen empfohlen wird (63,64), war die Frage von besonderem Interesse, ob das Corticosteron die Phalloidinwirkung auf die isolierte Rattenleber in irgendeiner Weise beeinflusst. Bei dem in Abb. 3 dargestellten Versuch sieht man zunächst, wie die Glykogensynthese bei einer Zufuhr von 50 gamma% Corticosteron pro Stunde ansteigt. Nach 3 Stunden, also zu einer Zeit, da in unserem Versuch die Corticosteronwirkung einzusetzen pflegte, fügten wir 0,5 mg% Phalloidin hinzu. Daraufhin kam es zum völligen Stillstand der Glykogensynthese mit Absinken des Leberglykogens, wie es für die Phalloidinvergiftung beim Ganztier (109) und bei der isolierten Leber (57) typisch ist. Auch das sofortige Versiegen des Galleflusses und die früher beschriebenen morphologischen Leberveränderungen stellten sich prompt ein. Eine Schutzwirkung des Corticosterons auf die vergiftete Rattenleber war somit nicht festzustellen. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Befunden von O. Wieland, Fischer und Reiter (109) überein, die bei Mäusen nach Injektion eines Gemischs von je 0,1 gamma Phalloidin und Amanitin pro g Körpergewicht keine Beeinflussung des Vergiftungsablaufs durch parenterale Zufuhr von Desoxycorticosteron und Glukose finden konnten.

Wir führten auch einige Versuche mit Insulin durch, das ebenfalls bei der Behandlung der Knollenblätterpilzvergiftung angewandt wird, da es die Glykogensynthese sogar bei niedrigem Blutzuckergehalt fördern soll (43). Die bisher vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse sind zwar unter sehr verschiedenen Versuchsbedingungen gewonnen, jedoch scheint daraus hervorzugehen, dass Leber- und peripheres Muskelgewebe in unterschiedlicher Weise auf Insulin ansprechen. Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass bei diabetischen Ratten nach Insulin-Injektion die Glykogensynthese des Zwerchfells im Inkubationsversuch sofort ansteigt (81), und dass sogar

invitro zugesetztes Insulin innerhalb von Minuten eine deutliche Steigerung der Glykogensynthese in Herz- und Zwerchfellmuskel normaler und adrenaletomierter Ratten bewirkt (8,81,92,104). Bei Leberschnitten erfolgt dagegen erst 48 Stunden nach Injektion von Insulin eine nennenswerte Synthesesteigerung, die als Reaktion auf die veränderten Stoffwechselerhältnisse in der Peripherie gedeutet wurde (81). Steiner, Rauda und Williams (96) beobachteten zwar, dass die in der diabetischen Rattenleber stark herabgesetzte Glykogensynthese (80,82,100) schon 2 Stunden nach Insulininjektion unter gleichzeitiger Zunahme der Synthetaseaktivität deutlich ansteigt, doch zeigte hier der in vitro - Versuch keine erkennbare Insulinwirkung auf die Leber. Dagegen konnten andere Untersucher den erniedrigten Glykogeneinbau in Leberschnitten diabetischer Ratten durch Zugabe von Insulin in vitro wieder normalisieren (42,100). Da die in solchen Leberschnitten vermehrte Aktivität der Glukose-6-Phosphatase sich durch Insulin senken ließ, folgerte man, dass das Hormon die Spaltung des Glukose-6-Phosphats in Glukose und anorganisches Phosphat hemmt(1). Nach Cori und Cori (17) ist eine Glykogensynthese in der Leber nur bei niedriger Glukose-6-Phosphataseaktivität möglich. Die Versuche von Steiner, Rauda und Williams (96) sprechen außerdem dafür, dass das Glukose-6-Phosphat als wichtiger Co-Faktor bei der Glykogensynthese wirkt.

Unsere Glykogensynthese-Versuche mit Insulin ergaben kein einheitliches Bild (Abb. 4). Wir führten sie in der Weise durch, dass zu Beginn 5 Einheiten glukagonfreies Insulin dem Perfusat zugesetzt und zusätzlich 1 Einheit pro Stunde infundiert wurde. Wie bei den Cortison-Versuchen wurde der Glukose-Anfangsspiegel von 400 mg% durch stündliche Infusion von 60 mg Glukose etwa konstant gehalten. Ein eindeutiger Insulineffekt war nicht erkennbar. Die Syntheseleistung schien zwar in 6 von 8

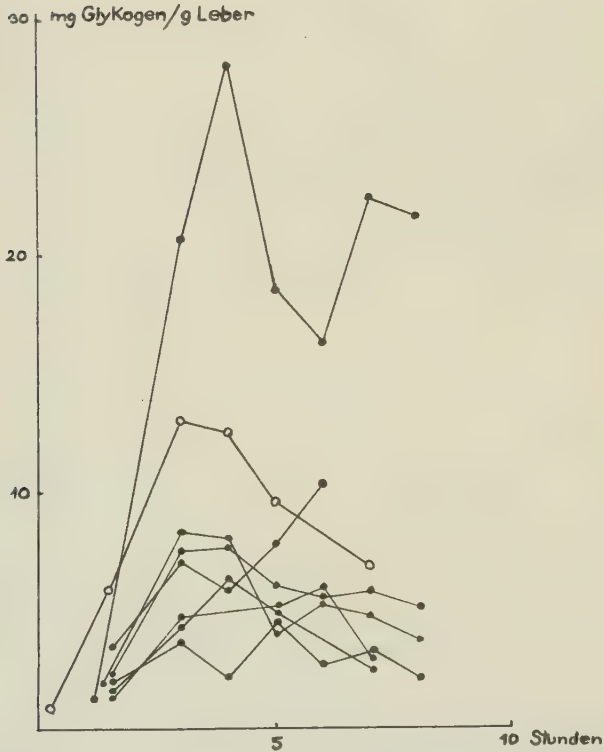
Versuchen gegenüber den Normalversuchen etwa erniedrigt, jedoch schwankten die Einzelwerte stark, zudem stiegen bei einem Versuch die Glykogenwerte auf die im Normalversuch nie erreichte Höhe von 28 mg/g Lebergewebe an.

Glykogenolyse der isolierten Rattenleber

Seit der Aufklärung der bei der Glykogensynthese in der Leber ablaufenden Enzymreaktionen durch Leloir et al. (47,48) weiß man, dass Auf- und Abbau des Glykogens auf verschiedenen Wegen vor sich gehen. Es mußte daher zwischen den beiden Möglichkeiten unterschieden werden, dass das Absinken des Glykogens in der phalloidinvergifteten Rattenleber entweder auf einer Hemmung der Glykogensynthese oder auf einer Aktivierung glykogenspalter Vorgänge beruhen kann. Wir verfolgten die Glykogenolyse in der isolierten Rattenleber, indem wir in regelmässigen Zeitabständen die Glukosekonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit bestimmten. Dabei verglichen wir die Wirkung des Phalloidins mit der des Glukagons, dessen glykogenolytische Wirkung nach den Versuchsergebnissen von Sutherland et al. (74,97,98) auf einer Aktivierung des Phosphorylasesystems beruht. Betrachtet man den in Abb. 5 dargestellten Normalversuch, so sieht man, dass zu Versuchsbeginn die durch die vorhergehende Operation bedingte vorübergehende Anoxämie des Lebergewebes sich in einer kurzdauernden Glukoseausschwemmung äußert. Sobald das Organ wieder gut durchblutet ist, sinkt die Glukose rasch wieder ab, wobei sich ein während des ganzen Versuchs etwa gleichbleibender Spiegel einstellt. Nur in manchen Fällen wies gegen Ende des Versuchs ein leichter Wiederanstieg der Glukose, begleitet von einer fleckigen Verfärbung der Leber und einem allmählichen Nachlassen des Galleflusses auf eine beginnende Schädigung des Organs. ^{hin} Setzte man

Abb. 4

Die Glykogensynthese in der isolierten Rattenleber nach 20stündigem Hungern, ● bei Zusatz von 5 E glukagonfreiem Insulin zu Versuchsbeginn und zusätzlicher Infusion von 1 E pro Stunde, ○ im Kontrollversuch. Dargestellt ist der Glykogengehalt in mg pro g Lebergewebe. Anfangsspiegel der Glukose in der Durchströmungsflüssigkeit: 400 mg%, zusätzlich Infusion von 60 mg/h.



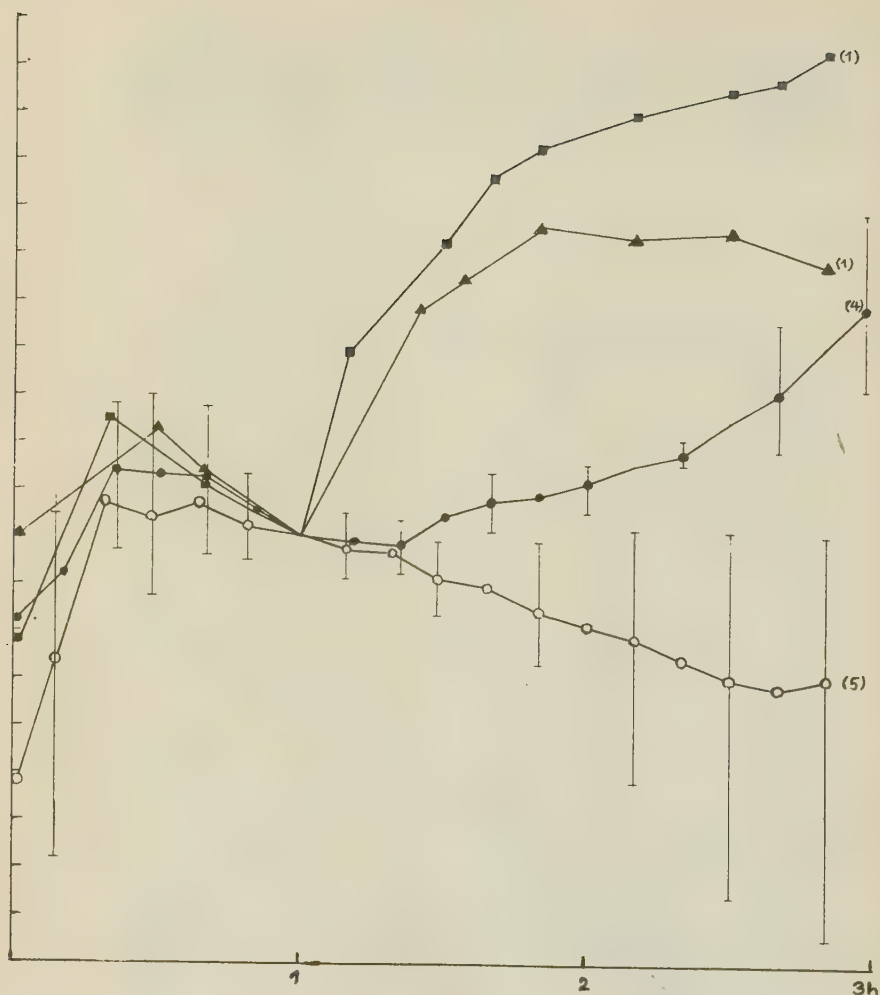


Abb. 5

Die Glykogenolyse der isolierten Rattenleber bei Zusatz von $1 \times 10^{-4} M$ Phalloidin (●), 12% Glukagon (■), 10 mg% 2,4-DNP (▲) sowie im Kontrollversuch (○). Die Substanzen wurden jeweils 60 min nach Versuchsbeginn zugesetzt. Dargestellt ist die prozentuale Änderung der Glukosekonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit, wobei die Kurven zum Zeitpunkt von 60 min gebündelt sind. Bei den Phalloidin- und Kontrollversuchen ist jeweils die Mittelwertskurve aus mehreren Einzelversuchen wiedergegeben, deren Anzahl am Kurvenende in Klammern angegeben ist. Die senkrechten Linien bezeichnen die Streubreite der Einzelversuche. Anfangskonzentration der Glukose in der Durchströmungsflüssigkeit: 100 mg%.

statt des Phalloidins 25 γ Glukagon zu so erfolgte eine sofort einsetzende erhebliche Steigerung der Glykogenolyse, die sich durch einen steilen Anstieg des Glukosespiegels im Durchströmungsmedium bemerkbar machte. Dagegen zeigte die Glukose nach Zusatz von 1×10^{-4} M Phalloidin ein ganz anderes Verhalten. Erst 1/2 bis 1 Stunde nach Vergiftung kam es zu einem allmählichen und zögernden Anstieg der Glukosekurve, die dann gegen Versuchsende, frühestens nach etwa 2 1/2 Stunden, einen steileren Verlauf nahm. Zu diesem Zeitpunkt war es jedoch stets zu erheblicher Vergrößerung und Verfärbung der Leber mit weitgehendem Zelluntergang im histologischen Bild gekommen, so dass die verstärkte Zuckerausschwemmung vielleicht nur als sekundäre Erscheinung infolge der Zellzerstörung zu werten ist.

Beim Ganztier konnten wir nach intraperitonealer Injektion von 6 γ /g Phalloidin überhaupt keinen Blutzuckeranstieg nachweisen.

Glykogenolyse im Leberschnitt

Da es von Interesse war, ob die phalloidinbedingte Glykogenmobilisierung auch in vitro stattfindet, führten wir Inkubationsversuche mit Leberschnitten unter Zusatz von Phalloidin durch. Diese boten zugleich eine zusätzliche Vergleichsmöglichkeit mit der phosphorylaseaktivierenden Wirkung des Glukagons, wie sie von Sutherland und Cori im Inkubationsversuch gezeigt worden ist (74, 97, 98). Wir untersuchten zunächst die Empfindlichkeit der Schnitte auf verschiedene Glukagonkonzentrationen, wobei sich eine deutliche Abhängigkeit der Glykogenolyse von der eingesetzten Hormonmenge ergab (Abb.6). Die stärkste glykogenolytische Wirkung wurde bei einer Glukagondosis von etwa 30 γ pro ml Inkubationsmedium erreicht. Überraschenderweise wurde bei einer Glukagondosis von 70 γ /ml wieder eine deutlich geringere Glykogenolyse gefunden (Abb.6). Abb. 7 zeigt den ent-

sprechenden Einzelversuch, wobei die Glukoseaus-schüttung pro g Lebergewebe etwa in Höhe der von Sutherland und Cori angegebenen Werte liegt (98).

Bei den Giftversuchen wurde das Phalloidin sowohl in vivo als auch in vitro verabreicht. Im ersten Falle wurden 10 Minuten vor Entnahme der Leber 3 oder 6 gamma Phalloidin intraperitoneal injiziert, im zweiten Falle wurde das Gift in verschiedenen Konzentrationen von 6×10^{-3} bis 8×10^{-4} der Inkubationsflüssigkeit zugesetzt. Abb. 8 zeigt die Mittelwertskurven der in vitro- und in vivo-Versuche. Danach ist im Inkubationsversuch weder nach vorhergehender Injektion des Phalloidins noch bei Giftzusatz in vitro irgendeine glykogenolytische Wirkung erkennbar.

Untersuchungen zur Frage einer Beeinflussung des Energiestoffwechsels durch Phalloidin

In weiteren Untersuchungen gingen wir der Frage nach, ob das Phalloidin eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung bewirkt, wie sie von Hess bei mit Digitonin vorbehandelten Lebermitochondrien beschrieben wurde (35). Auch hier verglichen wir das Phalloidin mit einer Substanz, für die eine entkoppelnde Wirkung als gesichert gilt. Das ist der Fall bei der Gruppe der Nitrophenole (31). Als Maß für die Atmung bestimmten wir die CO_2 -Bildung der Rattenleber im Perfusionsversuch mit Phalloidin und 2,4 - Dinitrophenol. Im Normalversuch bleibt die CO_2 -Bildung pro Zeiteinheit während der ganzen Versuchsdauer etwa konstant (Abb. 10). Setzt man bei Versuchsbeginn $1-2 \times 10^{-4} \text{M}$ Phalloidin hinzu, so ergibt sich keine deutliche Änderung des Kurvenbildes (Abb. 9). Dagegen macht sich nach Zugabe von 2,4-Dinitrophenol in der von Haas

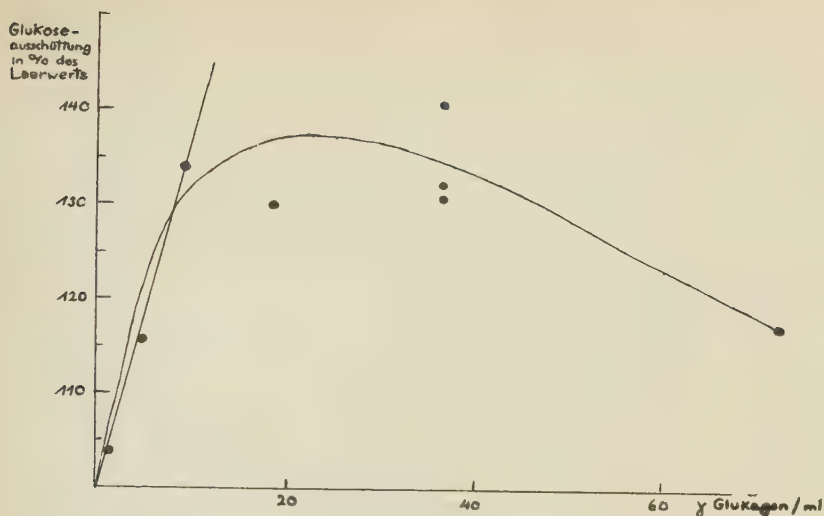


Abb. 6

Die Abhängigkeit der Glykogenolyse inkubierter Leberschnitte von der eingesetzten Glukagondosis. Dargestellt ist die Glukoseausschüttung bei verschiedenen Glukagonkonzentrationen zum Zeitpunkt von 30 min, ausgedrückt in % der Glukoseausschüttung im jeweiligen Kontrollversuch ohne Glukagon.

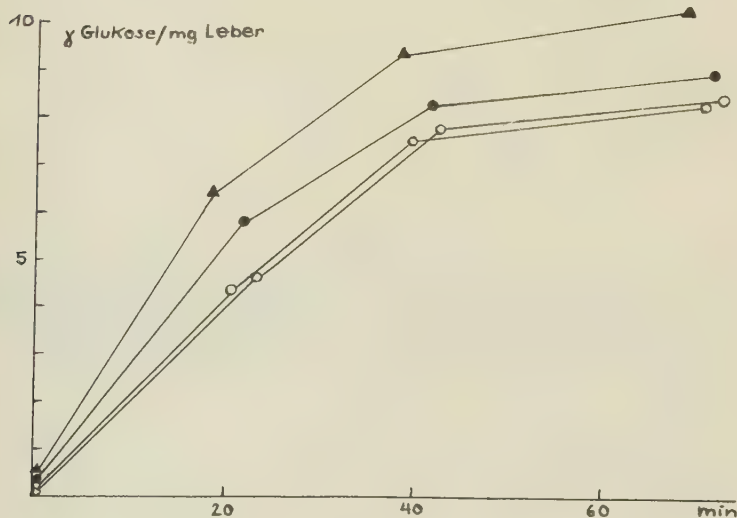


Abb. 7

Die Glykogenolyse durch inkubierte Leberschnitte in Krebs-Henseleit-Medium bei 37°C nach Zugabe von 36 γ (▲) und 72 γ (●) Glukagon sowie im Kontrollversuch (○), ausgedrückt in freigesetzter Glukose pro mg Lebergewebe.

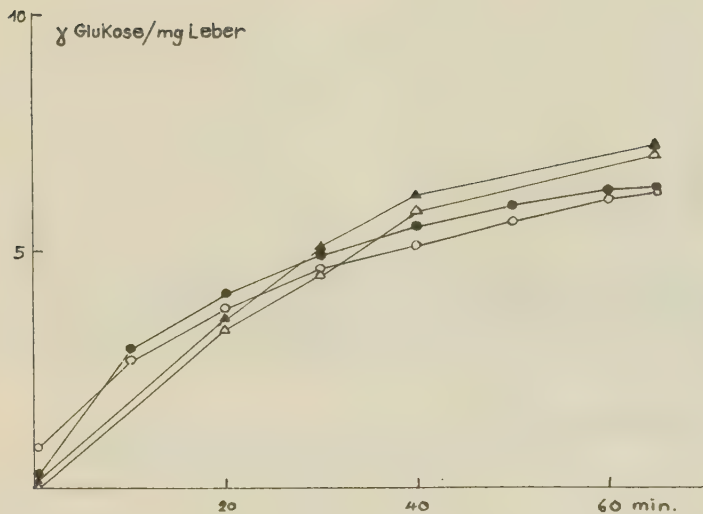
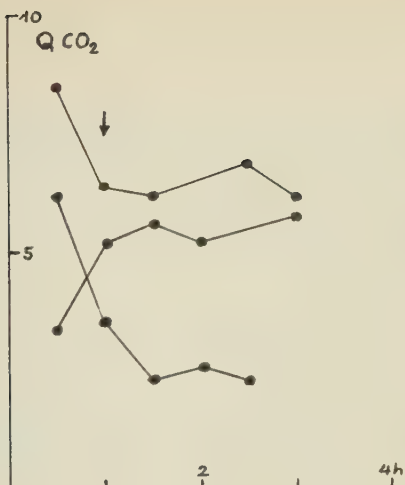


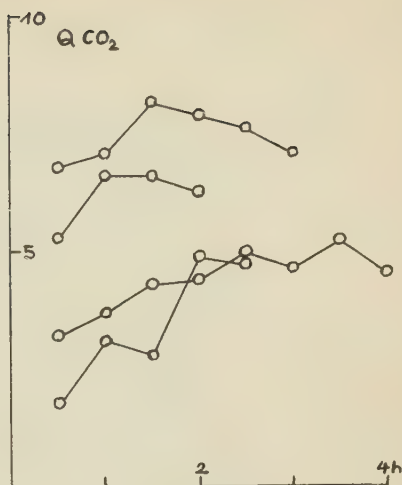
Abb. 8

Die Glykogenolyse durch inkubierte Leberschnitte in Krebs-Henseleit-Medium bei 37°C nach intraperitonealer Injektion von 3 - 6 γ Phalloidin 10 min vor Entnahme der Leber (●, Kontrolle ○) sowie nach Zusatz von 6×10^{-5} bis 8×10^{-5} M Phalloidin in vitro (▲, Kontrolle △), ausgedrückt in γ freigesetzter Glukose pro mg Lebergewebe. Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus mehreren Einzelversuchen.

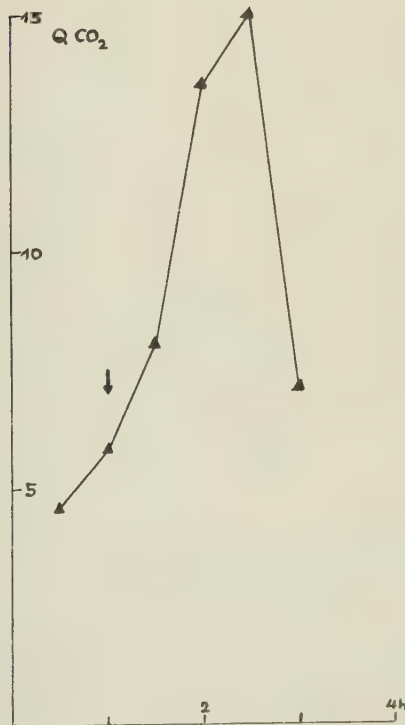
9.



10.



11.



12.

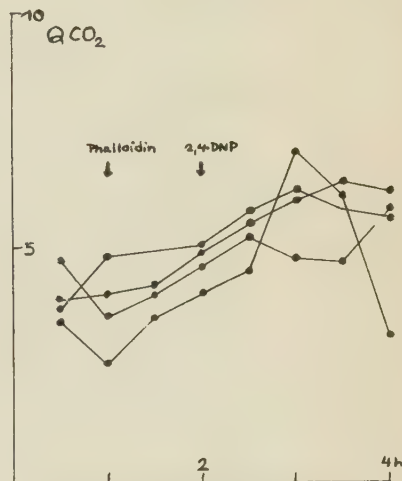


Abb. 9 - 12: Die CO₂-Bildung durch die isolierte Rattenleber (Q CO₂).

Abb. 9
Q CO₂ bei Zusatz von 1-2x10⁻⁴ M Phalloidin nach 1 Stunde (↓).

Abb. 10
Q CO₂ im Kontrollversuch.

Abb. 11
Q CO₂ bei Zusatz von 10 mg% 2,4-DNP nach 1 Stunde (↓).

Abb. 12
Q CO₂ bei Zusatz von 1x10⁻⁴ M Phalloidin nach 1 Stunde und 10 mg% 2,4-DNP nach 2 Stunden.

angegebenen Dosierung von 2,5 mg pro 100 g Körpergewicht (33) die Aufhebung der Atmungskontrolle sofort durch einen steilen Anstieg der QCO_2 -Werte bemerkbar. Diese sinken nach einiger Zeit wieder ab als Zeichen dafür, dass die Atmung zu versagen beginnt (Abb. 11).

Das 2,4-Dinitrophenol entfaltet ferner eine erhebliche glykogenolytische Wirkung (Abb. 5), wiederum in deutlichem Gegensatz zu dem spät einsetzenden und trägen Glukoseanstieg im Phalloidinversuch. Die Gallensekretion erfolgte zwar etwas langsamer als beim Normalversuch, hielt aber bis zum Ende des Versuchs an.

Bei einigen Versuchen kombinierten wir Phalloidin und 2,4-Dinitrophenol, indem wir nach der 1. Stunde das Phalloidin und nach der 2. Stunde das 2,4-Dinitrophenol zusetzten in der Erwartung, dass sich bei gleichem Wirkungsmechanismus ein Kumulationseffekt bemerkbar machen müsste. Die durch das 2,4-Dinitrophenol bedingte Atmungssteigerung war jedoch nach vorausgehendem Phalloidinansatz weitaus geringer und teilweise kaum erkennbar. Vielleicht ist die Atmung infolge der durch das Phalloidin bewirkten Zellschädigung zum Zeitpunkt des DNP-Einsatzes bereits latent^s gestört, so dass sie keiner wesentlichen Steigerung mehr fähig ist. Für eine Entkopplungswirkung des Phalloidins ergeben unsere Untersuchungen also keinen Anhalt.

Wir verfolgten auch in einigen wenigen Durchströmungsversuchen CO_2 -Bildung und Glukoseausschüttung nach Zugabe von Schilddrüsenhormonen, deren Wirkung nach einigen Autoren (36,46,52,53) ebenfalls auf einer Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung beruhen soll. So fanden Martius und Hess (53) nach Zugabe von Thyroxin in einer Konzentration von 5×10^{-5} - 10^{-4} M zu einer Aufschwemmung von Rattenlebermitochondrien einen Abfall

der oxydativen Phosphorylierung. Auffälligerweise bewirkten noch kleinere Thyroxindosen eher eine Steigerung der Phosphorylierung. Die genannten Autoren schliessen daraus, dass geringe Mengen an Schilddrüsenhormon für den Ablauf der Atmungskettenphosphorylierung erforderlich sind.

Für das Trijodthyronin ist ebenfalls eine Entkopplungswirkung beschrieben worden (36,51).

Wir setzten die Schilddrüsenhormone zu Versuchsbeginn dem Perfusat zu, und zwar Thyroxin Roche in einer Dosierung von 1 und 2 mg, das Trijodthyronin in einer Dosierung von 1 mg. Letzteres wurde in 1 ml 0,01% NaOH unter vorsichtiger Zugabe von 10% NaOH so aufgelöst, dass das pH nicht über 8,0 anstieg. Besonders unsere Thyroxin-Versuche zeigten einen ungewöhnlich steilen Abfall der Glukose im Durchströmungsmedium, die dann wieder ansteigen scheint (Abb. 13). Dagegen ließ die CO_2 -Bildung durch die Leber keine deutliche Beeinflussung erkennen, wenn wir auch den Eindruck eines leichten Kurvenanstiegs hatten (Abb. 14). Eine Erklärungsmöglichkeit für den eigenartigen Verlauf besonders der Glukosekurve läge darin, dass die anfangs noch niedrige Hormonkonzentration am Wirkungsort in der Leber zu der von Martius und Hess (53) beobachteten Steigerung der Atmungskettenphosphorylierung führt. Dieses Stadium wäre durch eine lebhaft Glykogensynthese mit Abfall der Glukose im Medium gekennzeichnet. Der durch laufende Aufnahme aus dem Medium ansteigende Hormongehalt der Leberzelle würde dann zu der für entkoppelnde Substanzen typischen Steigerung der Glykogenolyse und zu dem in unseren Versuchen allerdings nicht deutlichen Anstieg des QCO_2 führten. Unsere Ergebnisse berechtigen jedoch auf Grund der geringen Versuchszahl nicht zu einer endgültigen Aussage.

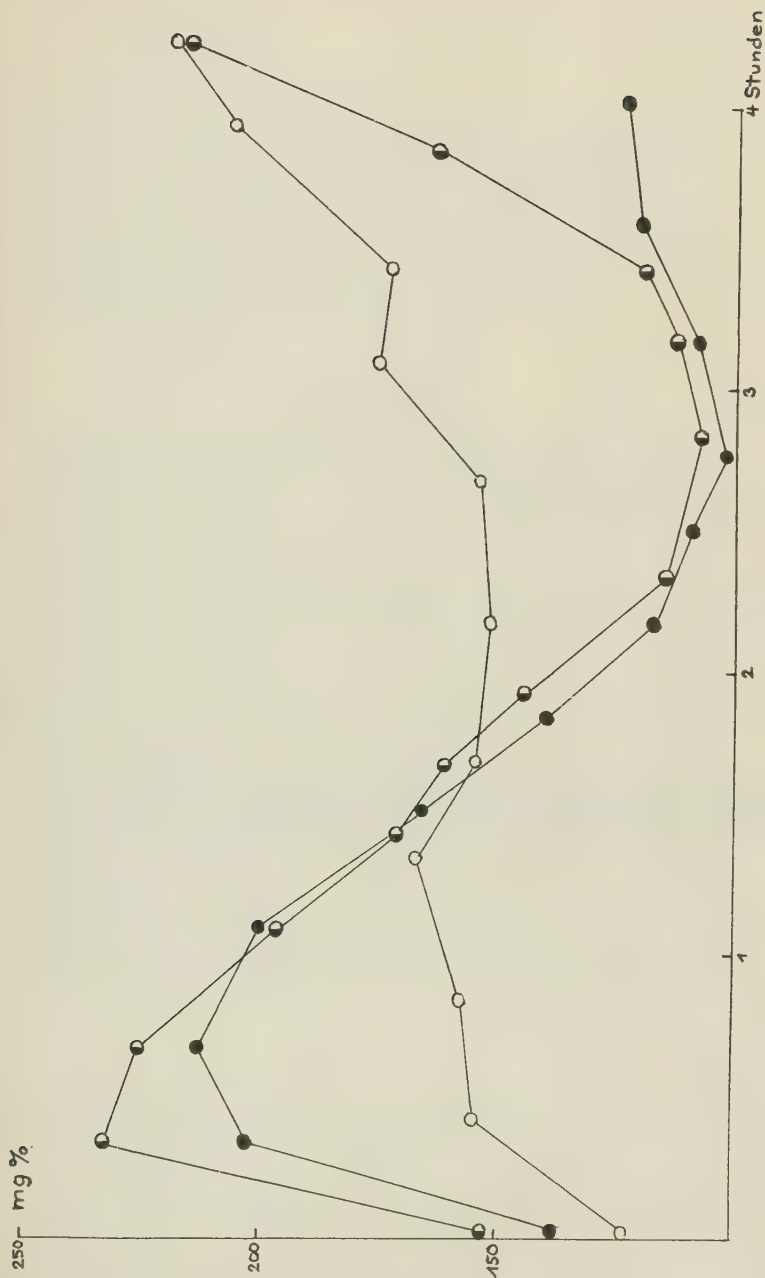


Abb. 13

Die Glykogenolyse der isolierten Rattenleber bei Zusatz von Thyroxin in einer Menge von 1 mg% (○) und 2 mg% (◐) sowie von 1 mg% Trijod-thyronin (●) 60 min nach Versuchsbeginn. Dargestellt ist die Änderung der Glukosekonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit. Glukoseanfangsspiegel: 100 mg%.

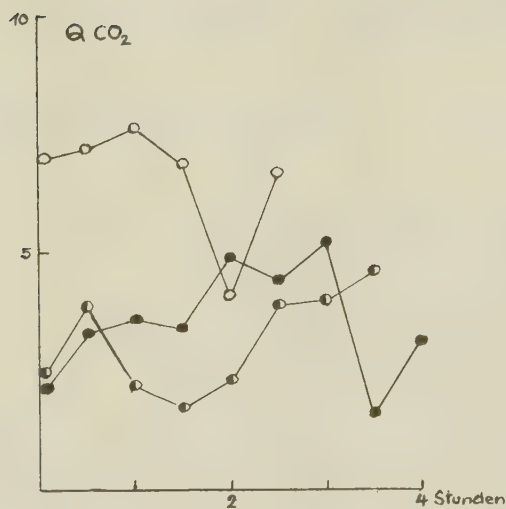


Abb. 14

Die CO_2 -Bildung durch die isolierte Rattenleber bei Zugabe von Thyroxin in einer Menge von 1 mg% (◐) und 2 mg% (●) sowie von 1 mg Trijodthyronin (○) 60 min nach Versuchsbeginn.

Milchsäure

Neben den durch das Phalloidin bewirkten Verschiebungen zwischen Glukose und Glykogen verfolgten wir auch das Verhalten der Milchsäure im Perfusat. Wir konnten jedoch keine Beeinflussung des Lactatspiegels durch zugesetztes Phalloidin feststellen. Abb. 16 läßt keinen Unterschied zwischen den Mittelwertskurven der Phalloidin- und Normalversuche erkennen.

Harnsäure

Die Harnsäure wurde sowohl im Serum des phalloidinvergifteten Ganztiers als auch im Durchströmungsversuch beobachtet. Abb. 15 zeigt die Serumwerte nach intraperitonealer Injektion von 3 gamma Phalloidin pro g Körpergewicht. Beim Normaltier fanden wir einen Harnsäurespiegel von etwa 3 mg%. Sofort nach Phalloidinvergiftung setzte ein bis zum Tode anhaltender Anstieg der Harnsäure im Serum ein, wobei je nach Überlebensdauer Werte um 25 mg% erreicht wurden. Bei Herabsetzung der Phalloidindosis auf 2 gamma pro g Körpergewicht erholte sich das Versuchstier wieder und wurde nach 6 Stunden getötet. Man sieht deutlich, wie der Harnsäurespiegel nach anfänglichem Anstieg wieder auf Normalwerte absinkt. Im Gegensatz zum Ganztier ließ sich im Durchströmungsversuch durch Zusatz von Phalloidin zum Perfusat keine Änderung des Harnsäurespiegels erzeugen. Eine Erklärung für diese Unstimmigkeit ist uns nicht bekannt.

Diskussion

Unsere Versuche haben zusammen mit anderen im hiesigen Laboratorium durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass bei Vergiftung der isolierten Rattenleber mit Phalloidin im wesentlichen dieselben morphologischen und biochemischen Veränderungen auftreten wie beim Ganztier. Daraus geht hervor, dass das Phalloidin direkt an der Leber angreift, und dass die an diesem Organ zu beobachtenden Erscheinungen nicht als Reaktion auf Veränderungen in der Peripherie aufzufassen sind. Ebenso entfällt die z.B. von Krause (43) diskutierte Möglichkeit, dass für die Wirksamkeit des Phalloidins eine vorherige Körperpassage erforderlich sein könnte. Die durch Beobachtungen am Ganztier und durch die Art der biochemischen Giftwirkungen nahegelegte Aussage, dass die Leber den hauptsächlichen Wirkungsort des Phalloidins darstellt, gewinnt damit an Sicherheit. Als widerlegt gelten kann dagegen die Erklärung der Phalloidinwirkung durch einen Hyperinsulinismus, der durch Zerstörung der alpha-Zellen des Pankreas (102) oder Hemmung der Insulinase (19) zustande kommen soll, zumal gerade die Störung des Kohlehydratstoffwechsels an der isolierten Leber in Form einer früh einsetzenden Synthesehemmung eindrucksvoll zutage tritt. Hingegen wird begreiflicherweise wegen des Fehlens der Peripherie die ^{mit} am Phalloidin vergifteten Ganztier zu beobachtende Hypoglykämie (54) vermisst. Beim Ganztier kommt hierfür auf Grund der zum Vergiftungsbild gehörenden Nierenveränderungen wie toxische Verfettung und tubuläre Nephrose (24,63,67,94,95) am ehesten eine renale Genese in Betracht.

Die inzwischen gelungene radioaktive Markierung des Phalloidins mit Tritiumgas und ³⁵S (75) hat nun auch den direkten Nachweis ermöglicht, dass sich das Phalloidin zum ganz überwiegenden Teil in der Leber ansammelt.

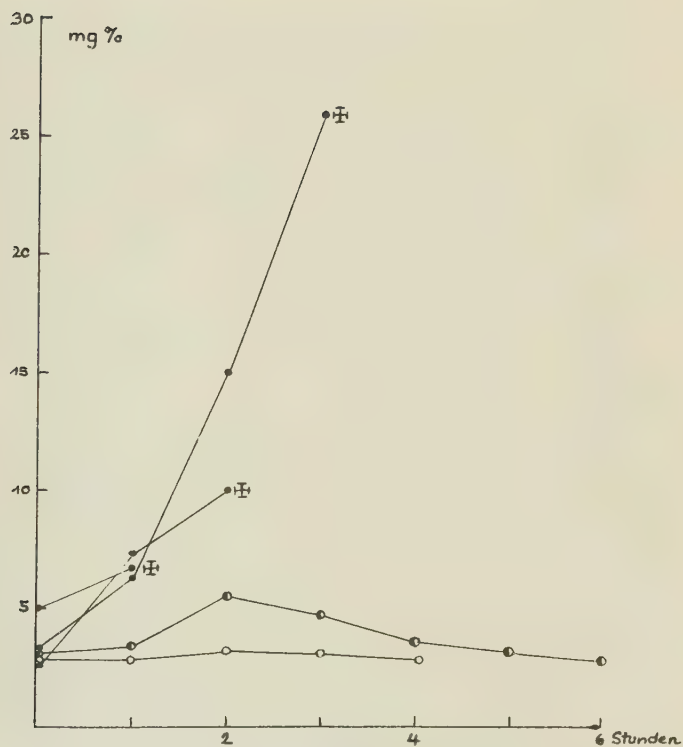


Abb. 15

Die Änderung des Harnsäurespiegels im Serum der weißen Ratte nach intraperitonealer Injektion von 2 g (○) und 3 g (●) Phalloidin pro g Körpergewicht sowie im Kontrollversuch (⊙).

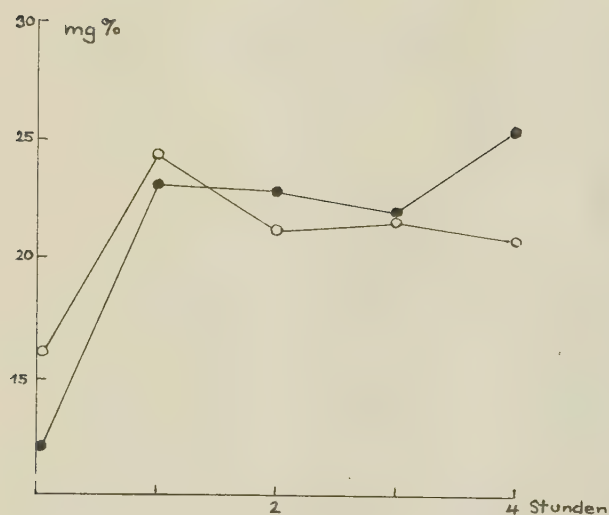


Abb. 16

Die Änderung der Milchsäurekonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit nach Zusatz von 1×10^{-4} M Phalloidin. Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus 5 Phalloidinversuchen (●) und 5 Kontrollversuchen (○).

Nach subcutaner Injektion des markierten Phalloidins bei Ratten wurden 57 % der Aktivität in der Leber wiedergefunden, während die übrigen Körpergewebe jeweils nur wenige Prozent enthielten und 10% im Urin ausgeschieden wurden (76).

Die leberspezifische Wirkung des Phalloidins wurde neuerdings von Fiume (27) dahingehend zu erklären versucht, dass das Phalloidin erst unter dem Einfluß bestimmter, offenbar vorwiegend an das endoplasmatische Reticulum der Leberzellen gebundener Enzyme (22), sogenannter "drug-metabolizing enzymes", zu einer toxisch wirkenden Substanz umgewandelt wird. Vor ihm waren schon v. d. Decken et al (20) auf Grund ihrer Versuche zu ähnlichen Schlußfolgerungen gekommen. Sie fanden bei Lebermikrosomen nur nach Vorinkubation mit Phalloidin eine Hemmung der Proteinsynthese, nicht jedoch wenn das Phalloidin direkt der Mikrosomensuspension zugesetzt wurde. Die Synthesehemmung war ferner von der Anwesenheit von TPNH abhängig, die eine Voraussetzung für die Aktivität der genannten metabolischen Enzyme darstellt. Bei dem an diesen Enzymen besonders armen Nierengewebe konnte überhaupt keine Synthesehemmung beobachtet werden. Demnach mußte bei Jungtieren, bei denen die drug-metabolizing enzymes noch nicht voll funktionsfähig sind, eine geringere Phalloidinempfindlichkeit zu erwarten sein. Tatsächlich überlebten eine Woche alte Jungnatten die Vergiftung mit der fünffachen Letaldosis an Phalloidin (27). Überdies waren Ratten, die bis zum Alter von 4 - 5 Monaten wöchentlich eine für Alttiere letale Phalloidindosis erhalten hatten, als erwachsene Tiere ebenfalls gegen die fünffache Letaldosis resistent (99). Offenbar waren die drug-metabolizing enzymes durch die den Jungtieren verabreichten Giftmengen in ihrer Entwicklung beeinträchtigt worden. Auch die von verschiedenen Autoren gefundene Phalloidinresistenz erwachsener Ratten nach Vorbehandlung mit leberwirksamen Giften wie Tetrachlorkohlen-

stoff (25), Na-Cinchophen (25), Alloxan (22,54,103) und Thioacetamid (111) läßt sich wohl nur dadurch erklären, dass diese Substanzen das Enzymgefüge der Leber schädigen und so die Umwandlung des Phalloidins in seinen toxischen Metaboliten hemmen, zumal ihre Schutzwirkung nur dann eintritt, wenn sie in bestimmtem zeitlichen Abstand vor dem Phalloidin verabreicht werden (25). In diesem Zusammenhang seien auch Versuche von Peczenik et al (70) erwähnt, die eine Schutzwirkung verschiedener Stoffe der Phenothiazingruppe gegenüber Phalloidin beobachteten. Da allerdings diese Substanzen bekanntlich die Funktionen des Hypothalamus beeinflussen, und andererseits bei phalloidinvergifteten Tieren sowohl Symptome von Seiten des Zentralnervensystems in Form von Krampfanfällen, Ähmungen und Störungen der Temperaturregulation (54,105,109) als auch histologische Veränderungen vor allem im Bereich des Hypothalamus gefunden wurden (6), schreiben die genannten Autoren den Phenothiazinsubstanzen eine Schutzwirkung auf den Hypothalamus der vergifteten Tiere zu.

Während alle bisherigen Untersuchungen bereits auf die Leber als hauptsächlichen Schauplatz der Giftwirkung hingenwiesen, blieb dennoch schon auf Grund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen unklar, welche unter den beobachteten Stoffwechselveränderungen dem primären Mechanismus der Giftwirkung entsprechen und welche als bloße Folgeerscheinungen angesehen werden müssen. Im Durchströmungsversuch bot sich die Möglichkeit, die zeitliche Aufeinanderfolge der durch das Gift aufgelösten Veränderungen zu beobachten. Im folgen sollen diese in der Reihenfolge ihres Auftretens betrachtet werden.

Als erstes faßbares Ereignis nach Zusatz selbst kleinster Phalloidinmengen kommt es innerhalb von Minuten zum völligen Stillstand des Galleflusses aus dem Ductus

choledochus. Diese in ihrer Plötzlichkeit eindrucksvolle Giftwirkung wurde erstmals von Matschinsky beobachtet (60). Die Bromsulphthaleinausscheidung durch die isolierte Rattenleber kommt nach Phalloidinzusatz ebenfalls sofort zum Stillstand (59). Weniger deutlich ist die Ausscheidungshemmung bei Bilirubin, wo ihr Eintritt vom Bilirubinspiegel im Perfusat abhängt. Bei höherem Spiegel nimmt die Bilirubinkonzentration im Serum nach Giftzusatz noch eine Zeit lang ab. Nach Matschinsky bleibt wahrscheinlich die Glukuronidbildung in den Leberzellen nach Aufhören der Ausscheidung noch einige Zeit ungestört.

Als nächstes Vergiftungssymptom treten bereits die ersten im gewöhnlichen Mikroskop sichtbaren morphologischen Veränderungen auf. Innerhalb der ersten halben Stunde nach Vergiftung wird in der Läppchen-Peripherie eine großtropfige Entmischung des Zellplasmas sichtbar, die sich in der Folgezeit immer mehr zum Läppchen-Zentrum hin ausdehnt; nach der ersten Stunde kommt es dann zur ebenfalls von der Peripherie zum Zentrum der Leberläppchen fortschreitenden Zellnekrose mit Blutungen ins Läppchengewebe. Nach einiger Zeit treten auch Nekrosen der Läppchen-Zentren auf, wie sie von Fühner (30) nach tödlicher Phalloidinvergiftung beim Menschen beschrieben werden. Auffallenderweise konnten wir in den Vakuolen keine Lipide nachweisen, obwohl die Leberverfettung zu den am häufigsten beschriebenen Sektionsbefunden nach tödlicher Knollenblätterpilzvergiftung gehört (24,43, 63,64). Nach histologischen Untersuchungen von M. Vogt (105) an phalloidinvergifteten Mäusen entwickelt sich eine Leberverfettung ^{nur} unter bestimmten optimalen Bedingungen. Bei einer Giftwirkung von weniger als 24 Stunden fehlte sie, bei länger überlebenden Tieren heilte sie wieder aus. Dabei bestand ein deutlicher Unterschied zwischen der im Zentrum beginnenden feintropfigen Ver-

fettung und einer zweiten Form von fettnegativen Vakuolen mit durch Eosin rotgefärbtem Hof, die zuerst in der Läppchen-Peripherie auftraten. Diese zweite Form der Vakuolisierung dürfte nach den von Vogt gebrachten Schwarzweißphotographien der von uns beobachteten entsprechen.

Eine halbe Stunde nach Vergiftung, also zu einer Zeit, da die beschriebenen histologischen Veränderungen bereits manifest zu werden beginnen, treten dann die ersten biochemisch erfaßbaren Giftwirkungen auf. Zunächst nehmen die Glykogenvorräte in der Leber ab, die bereits nach 2 Stunden nur noch ganz geringe Mengen enthält (57).

Wir konnten zeigen, dass dieser Glykogenverarmung eine schon sehr bald nach Vergiftung wirksam werdende Störung der Glykogensynthese zugrunde liegt. Lebern von Hungertieren, die im Durchströmungsversuch zu einem raschen Wiederaufbau ihrer Glykogenvorräte fähig sind, waren nach Phalloidinvergiftung nicht mehr in der Lage, Glykogen zu synthetisieren. Eine direkte Enzymschädigung durch das Phalloidin scheint dabei nicht vorzuliegen. Jedenfalls konnte Matschinsky keine direkte Giftwirkung auf das bei der Glykogensynthese wirksame Enzym Uridyldiphosphat-Glykogen-Transglukosidase (Synthetase) nachweisen (56).

Etwa gleichzeitig mit dem Abfall des Leberglykogens wird auch eine Abnahme der energiereichen Phosphate im Lebergewebe deutlich (57). Namentlich das ATP verhält sich ganz ähnlich wie es oben für das Leberglykogen beschrieben wurde. Viel geringer ist die Abnahme des ADP-Spiegels, infolgedessen sinkt der ATP/ADP-Quotient auf minimale Werte. Frühere Versuche, als Ursache hierfür eine direkte Einwirkung des Phalloidins auf die oxydative Phosphorylierung nachzuweisen, blieben erfolglos, da sowohl nach

vorheriger Injektion des Phalloidins als auch bei Zugabe des Gifts in vitro der P/O-Quotient sich nicht oder erst nach längerer Zeit veränderte (20,113,114). Auch der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Vergleich zwischen Phalloidin und 2,4-Dinitrophenol in ihrer Wirkung auf Atmungsintensität und Glykogenmobilisierung der durchströmten Rattenleber sprechen gegen eine entkoppelnde Wirkung des Phalloidins. Im Gegensatz dazu wurde allerdings beim phalloidinvergifteten Ganztier ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gefunden (113). Versuche von Hess (35), der an Rattenlebermitochondrien nach Zusatz von Phalloidin in vitro eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung beobachtete, können wohl nicht zum Vergleich herangezogen werden, da durch die Vorbehandlung mit Digitonin wesentlich andere Versuchsbedingungen angenommen werden müssen. Somit scheint der Verlust an ATP eher auf einem gesteigerten Zerfall zu beruhen, worauf schon die Zunahme von anorganischem Phosphat, Pentose, Harnsäure, wahrscheinlich auch Ribonucleinsäure und ähnlichen Substanzen im Serum hinweist, die als Zerfallsprodukte der energiereichen Phosphate aufgefasst werden können (60). Tatsächlich fanden Matschinsky und O. Wieland (60) an Lebermitochondrien phalloidinvergifteter Ratten einen Anstieg der Mg^{++} -aktivierbaren Phosphatase um 200%. Leider fehlen entsprechende Versuche für die durchströmte Rattenleber, so dass wir die Phosphataseaktivierung hier nicht zeitlich einordnen können. Es erscheint unverständlich, dass der gesteigerte ATP-Zerfall nicht doch zu einer Aufhebung der Atmungskontrolle führt. Zum Teil konnte hierfür eine Hemmung der Mg^{++} -aktivierbaren Phosphatase durch Succinat verantwortlich gemacht werden (60), das bei den besprochenen Versuchen als Substrat verwendet worden war. Eine Erklärung für das Ausbleiben einer Störung der Phosphorylierung bei Versuchen, die nicht mit Succinat durchgeführt wurden, insbesondere auch für die fehlende Steigerung der Atmungsintensität der isolierten Leber nach Zusatz von Phalloidin

vermögen wir nicht zu geben. Allenfalls wäre daran zu denken, dass durch die zunehmende Zerstörung der Leberzellen, wie sie im histologischen Bild sichtbar wird, die Atmung insoweit latent geschädigt ist, dass sie nicht wesentlich gesteigert werden kann.

Als weiteres Vergiftungssymptom beginnt nach den ersten 30 Minuten die Glutamat-Oxalat-Transaminase anzusteigen (60). Auch im Serum von Kaninchen ist nach Injektion von Phalloidin die SGOT erhöht (60), dementsprechend fand sich in der Leber phalloidinvergifteter Mäuse eine entsprechende Aktivitätsabnahme des Enzyms (54). Auffällig war bei den Kaninchen-Versuchen das Überwiegen der SGOT über die SGPT im Gegensatz zu den von der klinischen Diagnostik her für Leberzellschädigung bekannten Verhältnissen.

Während wie bereits beschrieben die Fähigkeit der Leber zur Glykogensynthese schon durch Phalloidindosen von 0,25 mg/100 ccm Perfusat sofort deutlich gestört wird und die bereits vorhandenen Glykogenreserven des Organs schon nach 30 Minuten abzunehmen beginnen, läßt sich zunächst kein entsprechender Glukoseanstieg im Medium nachweisen. Erst nach einer Latenzzeit von ca. 1 Stunde erfolgt eine langsame Zunahme der Glukosewerte. Ein nach frühestens 2 1/2 Stunden einsetzender steilerer Kurvenanstieg kommt wohl nicht mehr als Folge einer primären Phalloidinwirkung in Betracht und läßt sich wie bereits angedeutet vielleicht auf autolytische Vorgänge im Rahmen des histologisch zu dieser Zeit schon fortgeschrittenen Leberzellzerfalls zurückführen. Das zögernde Einsetzen der Glykogenolyse nach Phalloidinvergiftung im Vergleich zum Emporschnellen der Kurve bei Zusatz von Glukagon zur Durchströmungsflüssigkeit läßt eine Aktivierung der Phosphorylase durch das Gift ausgeschlossen erscheinen. Auch bei Inkubation von Leberschnitten mit Phalloidin und Glukagon

löste das Gift im Gegensatz zum Hormon keine Steigerung der Glykogenolyse aus. Für das alpha-Amanitin liegen Versuche von Reiter et al. (77,78) vor, wonach bei phalloidinvergifteten Ratten die Phosphorylaseaktivität in der Leber sogar abnimmt, jedoch nur bei Hungertieren. Im Hungerzustand ist jedoch die Phosphorylaseaktivität ohnehin vermindert, wenn auch nicht so stark wie nach zusätzlicher Vergiftung. Bei normal ernährten Tieren beginnt die Phosphorylase erst 16 Stunden nach Vergiftung abzusinken. Somit scheint die Aktivitätsabnahme der Phosphorylase nicht für die Phalloidinwirkung spezifisch zu sein.

Das verhältnismässig rasche Verschwinden des Leberglykogens steht in auffälligem Widerspruch zu dem langsamen Anstieg der Glukose im Durchströmungsmedium, so dass sich die Frage nach dem Verbleib des abgebauten Glykogens stellt. Eine einleuchtende Erklärung bestünde darin, dass der vermehrten Aufspaltung des Glykogens eine Aktivitätssteigerung der Amylasen zugrunde liegt. Die dabei entstehenden Oligosaccharide würden natürlich bei der enzymatischen Zuckerbestimmung nicht erfaßt, sondern müßten chromatographisch bestimmt werden. Das Phalloidin könnte dabei eine Freisetzung des Enzyms aus den Lysosomen bewirken. Matschinsky fand jedoch im Perfusionsversuch nach Zusatz von Phalloidin keinen höheren Anstieg der Amylase im Serum als beim Normalversuch (56).

Bei der Bewertung der im Vorstehenden geschilderten Befunde verdient der abrupte Stillstand des Galleflusses als erste erkennbare Auswirkung des Phalloidins besondere Beachtung. Neben dem sofortigen Verlust der Synthesefähigkeit für Glykogen lassen sich als nächstes Vergiftungssymptom bereits morphologische Zeichen der

Degeneration an den Leberzellen erkennen. Dieser zeitliche Vorrang der morphologischen Veränderungen vor dem ersten Auftreten biochemisch faßbarer Stoffwechselreaktionen legt die Folgerung nahe, dass das Phalloidin seinen ersten Angriff gegen die Strukturelemente der Zelle richtet. Vor allem spricht das Aufhören der Galleausscheidung wenige Minuten nach Eintritt des Gifts in die Leberzellen dafür, dass das Gift unmittelbar an den Zellgrenzflächen seine Wirkung entfaltet, so dass diese ihre Fähigkeit zur Galleausscheidung verlieren; ebenso ist aber auch die Vorstellung möglich, dass die Ausscheidung zwar erhalten bleibt, dass aber durch die Einwirkung des Phalloidins auf die Zellwände das von diesen begrenzte Hohlraumssystem der Gallekapillaren seinen Zusammenhang verliert und die Galle ins Interstitium abfließen lässt. Nimmt man die erste Möglichkeit an, so ergibt sich die Überlegung, dass der Durchtritt der Galle durch die Zellwand einmal als passiver Filtrationsvorgang aufgrund von Konzentrations- oder Potentialunterschieden, zum anderen als aktive Sekretionsleistung des lebenden Protoplasmas unter Verbrauch von Energie erfolgen kann. Eine Störung energieliefernder Prozesse durch das Phalloidin scheidet aber nach unseren Untersuchungen aus, da bei der Leberdurchströmung mit 2.4-Dinitrophenol der Gallefluß zwar etwas nachließ, aber noch mehrere Stunden bis Versuchsende anhielt. Die ersten Zeichen einer Schädigung des Energiestoffwechsels durch Phalloidin werden erst nach 30 Minuten in Gestalt des beginnenden ATP-Zerfalls deutlich (57).

Zu den frühesten Vergiftungssymptomen der isolierten Leber gehört die Störung der Glykogensynthese, die in ihrem Ausmaß und im Zeitpunkt ihres Eintritts eine deutliche Dosisabhängigkeit zeigt. Dass es sich dabei

aber nicht um den primären Angriffspunkt des Phalloidins handeln kann, zeigt sich darin, dass bei einer niedrigen Phalloidindosis von 0,125 mg% der Gallefluß sofort aussetzt, während die Glykogensynthese noch nicht beeinträchtigt ist.

Bei der Suche nach dem Mechanismus der Synthesestörung konnte Matschinsky zwar einen Aktivitätsverlust der Synthetase im Lebergewebe feststellen, da deren Aktivität jedoch von dem jeweiligen Glykogengehalt der Leber abhängt und auch beim Hungertier erniedrigt ist, muss ihre Abnahme als unspezifisches Symptom gewertet werden (56). Von Bedeutung erscheint jedoch die von Leloir et al. sowie Porter et al. (47,48,71) gefundene Abhängigkeit der Glykogensynthese von einer Einlagerung des Glykogens und des Enzyms in den Verband des endoplasmatischen Reticulums der Zelle, so dass auch hier daran gedacht werden muss, dass das Phalloidin primär an den Strukturen der Leberzelle angreift.

Diese Erklärung gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch analoge Ergebnisse bei der Untersuchung des Einflusses von Phalloidin auf die Proteinsynthese, die ebenfalls ans endoplasmatische Reticulum, und zwar an die in dieses eingelagerten Ribonucleidpartikel gebunden ist (20). Nach Phalloidinvergiftung in vivo wurde der Einbau von Aminosäuren sowohl in Rattenleberschnitte als auch in die Mikrosomenfraktion, jedoch nicht mehr in isolierte Ribonucleidpartikel gehemmt. Die Phalloidinwirkung scheint also auch hier an den Strukturen des endoplasmatischen Reticulums anzusetzen, da sie nur eintritt, wenn diese wenigstens in Form der Mikrosomen bis zu einem gewissen Grad erhalten sind. Die Tatsache, dass die wahrscheinlich für die toxische Wirkung des Phalloidins verantwortlichen drug-metabolizing enzymes im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert sind (22), spricht ebenfalls für eine frühzeitig eintretende Beziehung des Phalloidins zu diesen Strukturelementen der Zelle. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben inzwischen deutlichere Anhaltspunkte in dieser Richtung ergeben (62).

Bei den angeführten Versuchen von v. d. Decken et al (20) war bis gegen Versuchsende keine Störung der energieliefernden Mitochondrienfunktion erkennbar. Auch für die Glykogensynthesehemmung lässt sich eine Störung der Energiebildung als Ursache ausschliessen, da der ATP-Gehalt der Leber zu dieser Zeit noch kaum abgesunken war (57). Ausserdem war keine Steigerung der Atmungsintensität der durchströmten Leber als Anhaltspunkt für eine Störung der oxydativen Phosphorylierung nachweisbar. Erst 1/2 Stunde nach Phalloidinvergiftung setzte ein stärkerer ATP-Zerfall ein, der auf einen Aktivitätsanstieg der Mg^{++} -abhängigen Phosphatase zurückgeführt werden konnte (60). Das Überwiegen der Mg^{++} -aktivierbaren über die DNP-aktivierbare Phosphatase mit Absinken des Phosphatase-Quotienten von 3 auf 0,2 wies auf einen stark gestörten Funktionszustand der Mitochondrien hin. Auch das Auftreten von Enzymen im Serum, die normalerweise an die Mitochondrien gebunden sind (60), ließe darauf schliessen, dass das Phalloidin die Mitochondrienstruktur angreift. Gegen diese Möglichkeit sprechen allerdings in neuerer Zeit durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen, die keine nennenswerten Veränderungen an den Mitochondrien phalloidinvergifteter Tiere ergeben haben (62).

Ausserden Zerfallsprodukten der energiereichen Phosphate erscheinen im Serum noch eine Reihe von Bruchstücken des Eiweiß- und Purinstoffwechsels wie Tyrosin, Harnsäure, vielleicht auch Ribonucleinsäure und pentosehaltige Substanzen (60). Diese mannigfachen Spaltungsreaktionen lassen sich vielleicht durch das Austreten von Hydrolasen aus den Lysosomen erklären, wie es von DeDuve et al (4) bei den verschiedensten Leberschädigungen von längerem Hungern bis zur Tetrachlorkohlenstoffvergiftung gefunden wurde. Folglich hätten wir es bei diesen hydrolytischen Spaltungsreaktionen nicht mehr mit einer spezifischen Phalloidinwirkung, sondern mit allgemeinen

Vorgängen im Sinne nekrobiotischer und autolytischer Gewebsauflösung zu tun.

Wie erwähnt, ließe sich der am Ganztier nachgewiesene Anstieg der Harnsäure im Serum ebenfalls im Rahmen dieser Vorgänge verstehen. Andererseits erscheint es von Bedeutung, dass zumindest ein Teil der Reaktionen des Purinstoffwechsels strukturgebunden ist. Das gilt z.B. für die Uricase, wenn deren genaue Lokalisation auch noch unsicher zu sein scheint. Verschiedene Autoren geben als Ort der größten Uricase-Aktivität die Mikrosomen und Mitochondrien (89,90), die Mikrosomen allein (68), die Lysosomen (3) oder eine besondere Partikelfraktion (45) an.

Erwähnung verdient die Feststellung eines Harnsäurespiegels von 3 mg% im Serum der von uns untersuchten weißen Ratten. Fast alle Säugetiere vermögen die beim Purinabbau entstehende Harnsäure durch das hauptsächlich in Leber und Niere (27, 49) vorkommende Enzym Uricase weiter zu Allantoin und in geringem Umfang zu einigen anderen Reaktionsprodukten (27,72), zu oxydieren (14, 27, 49). Nur dem Menschen und den ihm nächststehenden Tieren, den anthropoiden Affen, ist dieses Enzym im Verlauf der Entwicklungsgeschichte offenbar verlorengegangen, so dass bei ihnen die Harnsäure das Endprodukt des Purinabbaues darstellt. Außerhalb der Anthropoiden-Gruppe ist noch bei einer bestimmten Haushundrasse, dem Dalmatiner, eine Ausscheidung von Harnsäure in grösseren Mengen gefunden worden. Diese Abweichung von der Norm beruht nicht auf einem Fehlen der Uricase (41), sondern auf einer Eigentümlichkeit der Nierenfunktion. Nach einigen Autoren ist die Fähigkeit zur Rückresorption in den Nierentubuli verlorengegangen (115), nach anderen findet sogar eine aktive Ausscheidung der Harnsäure durch die Tubuli statt (28,29). Bei der weißen Ratte scheint nach in der Literatur zu findenden Hinweisen (2) das Serum sowohl Allantoin als auch Harnsäure zu enthalten. Das Vorkommen der Harnsäure scheint demnach nicht auf dem Fehlen der Uricase

zu beruhen, deren Vorkommen auch verschiedentlich erwähnt wird (2,282,29). Da sich bei diesen Versuchen auch nennenswerte Harnsäuremengen im Urin der untersuchten Ratten fanden, wäre für diese Tierart eine ähnliche Anomalie der Nierenfunktion denkbar, wie sie beim Dalmatiner angenommen wird. In diesem Zusammenhang wäre die Frage von Interesse, ob der Harnsäureanstieg im Serum phalloidinvergifteter Ratten vielleicht auf eine Hemmung der Ausscheidung durch die Niere zurückzuführen ist. Friedman und Byers (28,29) fanden im Serum der weißen Ratte im Mittel 3,0 mg% Allantoin und 1,4 mg% Harnsäure. Da ihre Versuchstiere eine purinararme Diät erhielten, liegen die von ihnen gefundenen Harnsäurewerte niedriger als die unseren. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass hierbei auch Variationen innerhalb der verschiedenen Zuchtstämme eine Rolle spielen. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass es sich beim Dalmatinerhund und bei der weißen Ratte um domestizierte Tiere handelt. Erfahrungsgemäss treten bei solchen sehr häufig Defektmutationen auf, die infolge des Fehlens der natürlichen Selektion auch zur Vererbung gelangen.

Die vorstehenden Erwägungen über den Wirkungsmechanismus des Phalloidins haben inzwischen durch die bereits erwähnten Versuche mit radioaktiv markiertem Phalloidin eine eindrucksvolle Bestätigung erfahren (76). Entsprechend der sehr schnell eintretenden Giftwirkung auf die Gallenausscheidung erfolgte die halbmaximale Ausschöpfung des markierten Phalloidins aus dem Perfusat innerhalb 5 Minuten. Durch Umschalten auf giftfreie Durchströmungsflüssigkeit ließ sich die Aktivität nicht wieder auswaschen, so dass eine feste Bindung an die Leberstrukturen angenommen werden muss. Besonders aufschlussreich war die Auftrennung des Homogenisats der von diesen Versuchen stammenden Lebern in die einzelnen Fraktionen. Aus den Zellkernen und Zelltrümmern ließ sich die Aktivität leicht auswaschen, während sie an den Mitochondrien schon fester haftete. Als

völlig irreversibel erwies sich dagegen die Bindung des Gifts an die Mikrosomenfraktion. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den auf Grund biochemischer und morphologischer Untersuchungen gewonnenen Vorstellungen überein, dass das Phalloidin eine frühzeitige Wirkung auf die Strukturen des endoplasmatischen Reticulums ausübt und dann in zweiter Linie auch an der Mitochondrienstruktur angreift. Zur Frage, ob zwischen der Giftwirkung auf das endoplasmatische Reticulum und der Störung der Galleausscheidung ein Zusammenhang besteht, ist eine Aussage wohl noch nicht möglich. Bis jetzt ist es nicht gelungen, die Lokalisation des Phalloidins in der Leberzelle durch Autoradiographie direkt sichtbar zu machen, da die Methode nicht empfindlich genug ist (76). In der Zukunft sind besonders von elektronenoptischen Untersuchungen an den Ultrastrukturen der Zelle weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise des Phalloidins zu erwarten. Erste Versuche in dieser Richtung sind inzwischen von Miller und O. Wieland (62) an mit 10 gamma Phalloidin vergifteten Mäusen und an der isolierten Rattenleber nach Zusatz von 20 gamma Phalloidin zum Perfusat durchgeführt worden. Schon 10 Minuten nach Vergiftung traten bis zu 2 μ große, von einer Membran umschlossene Vakuolen im Cytoplasma auf (Abb. 17), deren Entstehung aus Erweiterungen des endoplasmatischen Reticulums zwar nicht bewiesen werden konnte, jedoch zumindest für einen Teil der Vakuolen sehr wahrscheinlich ist, zumal ihre Begrenzung den dreistufigen Aufbau der Elementarmembranen des endoplasmatischen Reticulums zeigt. Zum Teil scheinen die Vakuolen auch aus umschriebenen Colliquationsnekrosen des Cytoplasmas hervorzugehen. (Abb. 18) Ähnliche Vakuolen treten zwar nach anderen, auch unspezifischen Leberschädigungen ebenfalls frühzeitig auf; als Besonderheit der Phalloidinwirkung ist jedoch hervorzuheben, dass die Mitochondrien während der mehrstündigen Versuchszeit keine nennenswerten Veränderungen erkennen ließen, während sie

bei anderen Formen der Leberschädigung, z.B. der CCL_4 -Vergiftung, frühzeitig morphologische Degenerationerscheinungen aufweisen. Während also die am endoplasmatischen Reticulum sichtbaren Veränderungen im Einklang zu biochemischen Untersuchungen stehen, bei denen die an die genannten Strukturen gebundenen Vorgänge der Glykogen- und Eiweißsynthese eine frühzeitige Hemmung erkennen ließen, konnten den Störungen der Mitochondrienfunktion entsprechende Veränderungen nicht gefunden werden. 30 Minuten nach Vergiftung kam es erstmals zum Auftreten sogenannter autolytischer Vakuolen, die Mitochondrien, Teile des endoplasmatischen Reticulums und andere Zellbestandteile als Einschlüsse enthielten (Abb. 18). Solche Gebilde treten auch unter physiologischen Bedingungen bei Um- und Abbauvorgängen, vor allem aber bei den verschiedensten Schädigungen der Zelle auf. Sie enthalten saure Phosphatase und vermutlich auch andere saure Hydrolasen und sind somit den Lysosomen zuzurechnen. Veränderungen der eigentlichen Lysosomen, wie sie auf Grund der im Serum auftretenden Bruchstücke energiereicher Phosphate, des Eiweiß- und Purinstoffwechsels zu erwarten wären, wurden hingegen nicht beobachtet. Auch haben sich am Zellplasma bisher keine Erscheinungen finden lassen, die mit dem auffälligen und am frühesten auftretenden Symptome der experimentellen Phalloidinvergiftung, dem Stillstand der Gallenausscheidung in Verbindung gebracht werden könnten.

In Tabelle 1 soll nochmals eine Übersicht über die bis jetzt bekannten Wirkungen des Phalloidins in der Reihenfolge ihres Auftretens vermittelt werden, soweit dieses zeitlich genau zu erfassen bzw. in der Literatur angegeben ist.

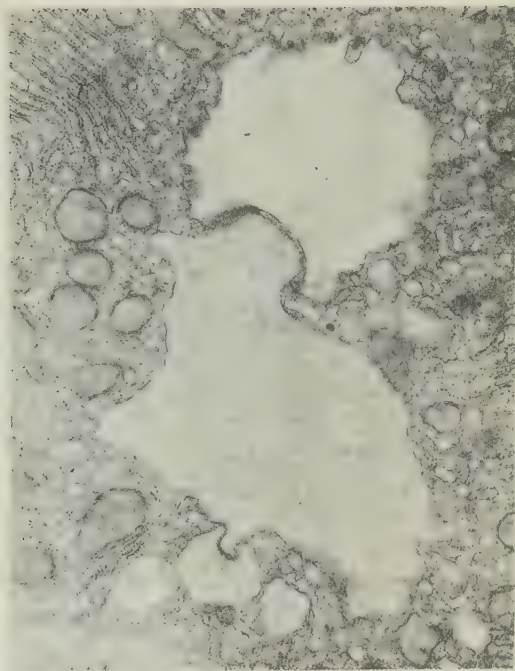


Abb. 17

Vakuolenbildung im endoplasmatischen Reticulum der Leberzelle beim Durchströmungsversuch mit 20 gamma Phalloidin. Vergrößerung 19000 : 1.

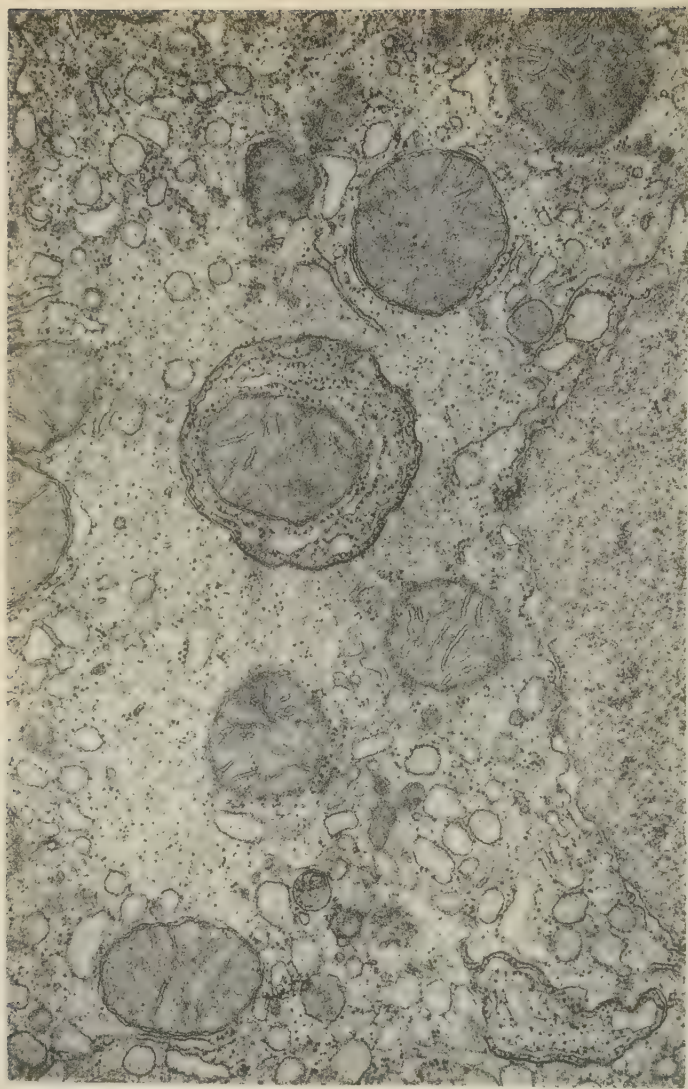


Abb. 18

autolytische Vakuole im Leberzellplasma mit Einschluß eines Mitochondriums (Autophagozytose). Der aufgehellte Protoplasmabezirk in der Umgebung der Vakuole entspricht einer umschriebenen Kolliquationsnekrose. Durchströmungsversuch mit 20 gamma Phalloidin. Vergrößerung 36000 : 1.

Tabelle 1

SYMPTOM	METHODE	ZEITPUNKT D. AUFTRETENS NACH PHALLOIDINAPPLIK.	LIT.
Versiegen des Galleflusses u. der Bromsulphthaleinausscheidung	durchströmte Rattenleber	wenige Minuten	60
Hemmung d. Glykogensynthese	durchströmte Rattenleber	" "	vorl. Arbeit
halbmaximale Ausschöpfung radioaktiv markierten Phalloidins aus dem Perfusat und Bindung an die Mikrosomen	durchströmte Rattenleber	5 Min.	76
Vakuolenbildung im endoplasmatischen Retikulum	Elektronehmi- roskop.Ganztier (Maus) und durchstr.Ratten- leber	10 Min.	62
erste im Lichtmikroskop sichtbare Veränderungen: Vakuolenbildung in den Leberzellen der Läppchen-Peripherie	Lichtmikroskop- Ganztier (Maus) und durchstr. Rattenleber	10 Min.	vorl. Arbeit 62, 105
ATP-Zerfall im Lebergewebe	durchströmte Rattenleber	1/2-1 h	57
Aktivitätsminderung mitochondrialer Enzyme im Lebergewebe, entsprechender Anstieg im Serum	Ganztier (Maus,Kanin- chen)	1/2-1 h	54, 60
Glukoseausschüttung ins Medium	durchströmte Rattenleber	1/2-1 h	vorl. Arbei
Anstieg der SGOT im Medium	durchströmte Rattenleber	1h	57
Hemmung der Proteinsynthese	Ganztier, Leberschnitte, Lebermikrosomen (Ratte, Maus)	1h	20, 54

Tabelle 1

SYMPTOM	METHODE	ZEITPUNKT D. AUFTRETENS NACH PHALLOIDINAPPLIK.	LIT.
Absinken des ATPase- Quotienten	Ganztier (Ratte)	1 h	60
Anstieg des Harnsäure- spiegels im Serum	Ganztier (Ratte)	1 h	vorl. Arbeit
Anstieg v. Bilirubin, anorgan. Phosphat, Tyrosin, Harnsäure u. pentosehaltigen Substanzen	Ganztier (Kaninchen)	5 h	60

Abschliessend soll noch auf den gegenwärtigen Stand der Therapie der Knollenblätterpilzvergiftung eingegangen werden. Diese hat sich bisher im großen und ganzen auf mehr oder weniger symptomatische Behandlungsmaßnahmen beschränken müssen. Außer einer Substitution der durch die gastrointestinalen Erscheinungen bedingten Flüssigkeits- und Elektrolytverluste wird vor allem die Verabreichung von Nebennierenrindenhormonen (51,64), Glukoseinfusionen (5,7,24,43,64) und Cholin oder Methionin (5) empfohlen. Unsere Versuche ergaben keinerlei Anhalt für eine Schutzwirkung der Nebennierenrindenhormone auf die Glykogensynthese in der isolierten Rattenleber. O. Wieland, Fischer und Reiter (109) gelangten beim Ganztier zu ähnlichen Ergebnissen, Demgegenüber beschrieben Peczenik et al. (70) eine Herabsetzung der Mortalitätsrate mit 2 gamma/g Phalloidin vergifteter Mäuse durch perorale Gaben von Dexamethason. Auch der Wert der intravenösen Glukosezufuhr muss zumindest in ihrer Wirkung auf die Leber angezweifelt werden, da diese ja gar nicht mehr zur Verwertung nennenswerter Glukosemengen fähig ist. Die bei unseren Glykogensynthesversuchen gemachte Feststellung, dass Lebern von Hungertieren weitaus empfindlicher auf das Phalloidin reagieren, indem schon sehr geringe Giftmengen zur Auflösung der Synthesestörung genügen, kann nicht auf den Kohlehydratmangel allein zurückgeführt werden, da die Wirkung des Hungers auf den Zellstoffwechsel weit allgemeinerer Natur sind (4,56,77,78). Auch das Cholin hatte in Versuchen von Reiter und O. Wieland bei Vergiftung mit alpha-Amanitin keine lebensverlängernde Wirkung (79).

Ein Versuch zur gezielten Therapie der Knollenblätterpilzvergiftung ist mit einem vom Institut Pasteur, Paris, hergestellten antitoxischen Pferdeserum, dem

Serum antiphalloidien gemacht worden (23). Jedoch konnte Matschinsky (55) damit keine lebensverlängernde Wirkung bei Mäusen erzielen. Bei papierelektrophoretischer Untersuchung war ausserdem keine Komplexbildung zwischen dem tritiummarkierten Phalloidin und dem Serum antiphalloidien nachweisbar, so dass der Wert dieser wie auch aller anderen bisher bekannten Behandlungsmaßnahmen zweifelhaft bleibt.

Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin auf die isolierte Rattenleber untersucht mit dem Ziel, durch unmittelbare Beobachtung von Reihenfolge und Verlauf der Vergiftungserscheinungen zu genaueren Vorstellungen über den Mechanismus der Giftwirkung zu gelangen. Das Phalloidin ruft an der isolierten Rattenleber dieselben morphologischen und biochemischen Veränderungen hervor, die am vergifteten Ganztier zu beobachten sind. Es werden Befunde verschiedener Autoren aufgeführt, wonach die Leberspezifität des Gifts auf im endoplasmatischen Reticulum der Leberzellen lokalisierte drug-metabolizing enzymes zurückgeht, die das Phalloidin in eine toxisch wirksame Substanz umwandeln

Bei Durchströmung der Rattenleber kommt es wenige Minuten nach Phalloidinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit zum völligen Stillstand des Galleflusses. In der ersten halben Stunde nach Vergiftung finden sich bereits morphologische Veränderungen in Form einer von der Peripherie zum Zentrum fortschreitenden vakuolären Degeneration des Zellplasmas mit nachfolgenden Zellnekrosen und ausgedehnten Blutungen ins Leberparenchym. Eine Leberverfettung wurde im Durchströmungsversuch niemals nachgewiesen.

Phalloidinkonzentrationen von mindestens 0,25 mg% bewirken eine sofort einsetzende Hemmung der Glykogensynthese, deren Ausmaß eine deutliche Abhängigkeit von der Giftdosis zeigt. Erst nach einer Latenzzeit von etwa 1 Stunde erfolgt ein allmählicher Austritt von Glukose aus der Leber. Eine Aktivierung der Phosphorylase durch das Phalloidin konnte durch den Vergleich der glykogenolytischen Wirkung von Phalloidin und Glukagon auf die isolierte Rattenleber und auf inkubierte Leberschnitte ausgeschlossen werden.

Corticosteron bewirkt an der isolierten Rattenleber nach einer Latenzzeit von mindestens 3 Stunden eine deutliche Steigerung der Glykogensynthese. Eine Schutzwirkung des Hormons auf die Glykogensynthese nach Zusatz von Phalloidin zur Durchströmungsflüssigkeit konnte nicht beobachtet werden.

Die CO_2 -Bildung der isolierten Rattenleber zeigt nach Vergiftung mit Phalloidin keine Zunahme, während sie bei Zusatz von 2,4-Dinitrophenol, das die oxydative Phosphorylierung entkoppelt, steil ansteigt. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Substanzen liegt in ihrer verschiedenartigen glykogenolytischen Wirkung. Somit fand sich kein Anhalt für eine entkoppelnde Wirkung des Phalloidins auf die oxydative Phosphorylierung.

Der Milchsäurespiegel im Rattenserum und in der Durchströmungsflüssigkeit beim Perfusionsversuch läßt keine Beeinflussung durch Phalloidin erkennen.

Die Veränderungen des Harnsäurespiegels nach Vergiftung mit Phalloidin stellen einen empfindlichen Indikator für die Stärke der Giftwirkung dar. Nach intraperitonealer Injektion von 3 gamma/g Phalloidin steigt die Harnsäure im Serum bis auf 25 mg% an. Erholt sich das Versuchstier wieder, sinkt der Harnsäurespiegel wieder auf normale Werte ab. Im Serum der bei unseren Untersuchungen verwendeten Ratten wurde ein Harnsäurespiegel von ca. 3 mg% festgestellt. Die Bedeutung dieses Befundes wird diskutiert.

Die bisher vorliegenden Versuchsergebnisse sprechen dafür, dass das Phalloidin in erster Linie an den Strukturelementen der Zelle angreift. Als Hauptorte der Giftwirkung werden die Leberzellgrenzflächen und das endoplasmatische Reticulum angesehen. Für die später auftretenden Schädigungen der Mitochondrien ist ein ähnlicher Wirkungsmechanismus anzunehmen. Der weitere Verlauf der Vergiftung dürfte auf unspezifischen Vorgängen der Auto-

lyse und Nekrobiose beruhen. Weitere Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus des Phalloidins sind am ehesten von elektronenoptischen Untersuchungen der Ultrastruktur der Zelle zu erwarten. Die bis jetzt vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunde werden beschrieben und diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Ashmore, I., A.B. Hastings
F.B. Nesbett u.A.E. Renold J.biol.Chem., 218, 77, 1956.
2. Bass, A.D., J. Teppermann,
D.A. Richert, W.W. Wester-
field Proc.Soc. exp.Biol. Med.,
73, 687, 1950
3. Beaufay, H., B.S. Bendall,
P. Baudhuin, R. Wattiaux
u. C. deDuve Biochem. Journ. 73,
628, 1959
4. Beaufay, H., E.v.Campenhout
u. C. deDuve Bioch. Journ., 73, 617,
1953
5. Binet, L. u. M. Leblanc Ann. Inst. Pasteur, 85,
179, 1953.
6. Binet, L. u. M. Leblanc Pr.med. 66, 1413, 1958
7. Binet, L. u. J. Marek C.R. Acad. de Sciences
d.l.Soc. biol., 147, 669,
1949.
8. Bleehen, N.M., R.B. Fischer Journ. Physiol., 123,
260, 1954.
9. Boehringer, C.F. & Söhne,
Mannheim Sammlg. v. Laboratoriums-
vorschriften ("Biochemi-
ca Boehringer")
10. Brauer, C., A. Pesotti u.
L. Pizzolato Proc. Soc. exp. Biol. Med.,
78, 174, 1951.

11. Broh-Kahn, R.H. u. A. Mirsky, Arch. Biochem. Biophys., 20, 10, 1949.
12. Chargaff, E., I.N. Davidson The Nucleic Acids Academic Press, New York, 1955, Bd. 2, S. 227.
13. Chiu, C. Y., Biochem. Journ., 46, 120, 1950.
14. Christman, A. Physiolog.Rev., 32, 301, 1951.
15. Civen, M. u. W.E.Knox J. biol. Chem., 234, 1787, 1958.
16. Copenhaver, J.H., I.G. Shipley u. R.K. Meyer Arch.Biochem.Biophys., 34, 360, 1951.
17. Cori, G.T. u. Cori, C.F. Journ. biol.Chem., 199, 661, 1952.
18. Cova, N. Il Farmaco, 12, 5, 1957.
19. Degenhardt, J., H.J. Hübner I.Alester J.physiol.Chem., 323, 278, 1961.
20. Decken, A.v.d., H. Loew u. T. Hultin Biochem. Z., 332, 503, 1960.
21. Dixon, M. Methods in Enzymology ed. Colowick, S.P. and M.O. Kaplan, New York Acad. Press, Bd. 1, 444, 1950.
22. Dixon, R.L., L.G. Hart u.J.R. Fouts J. Pharmacol.-exptl. Therap. 133, 7, 1961.

23. Dujarric de la Rivière, R. Bul. Acad. med., Paris, 94,
1000, 1925.
24. Fabian, G. Das Deutsche Gesundheits-
wesen, 5, 780, 1950.
25. Floersheim, G.L. Persönl.Mitteilung
26. Fiume, L. The Lancet, I, 1284, 1965
27. Franke, W. Zschr.f.Vitamin-, Hormon-,
u. Fermentf., 5, 279, 1952.
28. Friedman, M. u. S.O. Byers J. biol. Chem., 175, 727,
1948.
29. Friedman, M. u. S.O. Byers Am. J. Physiol., 1963, 684,
1950.
30. Fühner, H. Medizin.Toxikologie, G.
Thieme-Verl., Stuttgart,
1951, (s. 210).
31. Glatke, E. u. E. Liss Biochem. Z., 331, 65, 1958.
32. Good, C., H. Kramer u.
M. Somogyi J. biol. Chem., 140, 485,
1933
33. Haas, B., Arch. exp. Path. Pharm.
204, 110, 1947.
34. Haas, H. u. G. Gossner Pilze Mitteleuropas,
Frankh'sche Verlagsbuchh.,
Stuttgart 1964.
35. Hess, B. Biochem. Z., 328, 325, 1956.

49. Leone, E. Biochem. Journ., 54, 393, 1953.
50. Long, C.N.H., B. Katzin u. E. G. Frey Endocrinology, 26, 309, 1940.
51. Ludwig, H. Schweiz.med.Wschr., 92, 1222, 1962.
52. Martius, C., H. Bieling u. D. Nitz-Litzow Biochem. Z., 327, 163, 1955.
53. Martius, C. u. B. Hess Arch. Biochem. Biophys., 33, 486, 1950.
54. Matschinsky, F. Dissertation, München 1959.
55. Matschinsky, F. Kliwo, 40, 138, 1962.
56. Matschinsky, F. unveröffentlicht.
57. Matschinsky, F., U. Meyer u. O. Wieland Biochem. Z., 333, 48, 1960.
58. Matschinsky, F., U. Meyer u. O. Wieland Kliwo, 39, 918, 1961.
59. Matschinsky, F., U. Meyer u. O. Wieland World Congr- on Gastro- enterology, München, Mai 1962.
60. Matschinsky, F. u. O. Wieland Biochem. Z., 333, 33, 1960.
61. Miller, L.L., C.G. Bly, M.L. Journ. exp. Med., 98, 174, Watson, u. W. F. Bale 1951.
62. Miller, F. u. O. Wieland in Vorbereitung.

76. Rehbindner, D., G. Löffler,
C. Wieland u. Th. Wieland Hoppe-Seylers Z., physiol.
Chem., 331, 132, 1963.
77. Reiter, M. Biochem. Z., 328, 408, 1957.
78. Reiter, M. u. J. Noe Biochem. Z., 328, 454, 1957.
79. Reiter, M. u. O. Wieland Klin. Wschr. 28, 615, 1950
80. Renold, A.E., A.B. Hastings
F.B. Nesbett Journ. Biol.Chem., 209,
687, 1954.
81. Renold, A.E., A.B.Hastings
F.B. Nesbett u. J. Ashmore Journ. biol.Chem., 213,
135, 1955.
82. Renold, A.E., C.C. Teng u.
F.B. Nesbett Jarn. biol. Chem., 204,
533, 1952.
83. Roch, M. Ärztl. Monatshefte, 5, 57
1949.
84. Roch, M. Schweiz. Med. Wschr., 1936,
S. 1025.
85. Romeis, B. Mikroskopische Technik,
München 1948, S. 245.
86. Sahyun, M. Journ. biol. Chemie., 93,
227, 1931.
87. Sahyun, M. Journ. biol. Chem., 103,
203, 1933.
88. Schimassek, H. Biochem. Z., 336, 460, 1963.
89. Schneider, W.C. u. G.H.
Hogeboom Journ.biol.Chem., 195, 161,
1952.

103. Verne, J., P.F. Ceccaldi u. S. Hebert C.R. Soc. Biol., Paris, 144, 741, 1950.
104. Verzâr, F. An. New York, Acad. Sci., 54, 716, 1951.
105. Vogt, M. Arch. exp. Path. Pharm., 190, 406, 1938.
106. Warburg, O. Biochem. Z., 142, 317, 1923.
107. Wieland, O. Habilitation, München 1951.
108. Wieland, O. Biochem. Z., 329, 568, 1958.
109. Wieland, O., H. Fischer u. M. Reiter Arch. exp. Path. Pharm., 215, 75, 1952.
110. Wieland, O., P. Reinwein u. F. Lynen Biochem. Problems of Lipids ed Popjak, G. u. Le Breton, E., Butterworth Scientific Publications, London 1955, S. 155
111. Wieland, O. u. A. Szabados VI. Internat. Kongr. f. Klin. Chemie, München, 26.-30.7.1966, Zus.Fass. Enzymologia biologica et clinica.
112. Wieland, Th. u. K. Dose Biochem. Z., 327, 345, 1956.
113. Wieland, Th. u. K. Dose Biochem. Z., 325, 439, 1954.

114. Wieland, Th. u. O. Wieland Pharmacol. Rev., 11, 1, 78,
1959.
115. Wolfson, W.O., C. Cohn, Journ. exp. Med., 92, 121,
C. Shore 1950.

Lebenslauf

- Am 20. Febr. 1933 in Jena geboren als Sohn des Kaufmanns Sigmund Meyer und seiner Ehefrau Margarete, geb. Peters.
- Ab 1936 Aufenthalt in Bronxville, New York, USA.
- 1939 bis 1942 Besuch der ersten 4 Klassen der Public School in Bronxville.
- 1942 Rückkehr nach Deutschland.
- 1942 bis 1944 Besuch der 3. und 4. Volksschulklasse in Jena.
- 1944 bis 1945 Besuch der zwei ersten Klassen des humanistischen Gymnasiums in Jena.
- Mai 1945 Umzug nach Heidenheim a. Brenz.
- 1945 bis 1951 Besuch des Realgymnasiums in Heidenheim. Reifeprüfung im Juni 1951.
- 1951 bis 1957 12-semesteriges Studium der Biologie, Chemie und Geographie an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München mit Ausnahme des an der Universität Freiburg/Brsg. verbrachten Sommersemesters 1954.
- Okt. 1957 Naturwissenschaftliches Staatsexamen in München
- Wintersem. 1957/58 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Universität München.
- April 1959 Ärztliche Vorprüfung in München.
- Juni 1962 Ärztliche Prüfung in München
- Juli 1962 bis Febr. 1963 Medizinalassistent an der Medizinischen Poliklinik der Universität München.

Juni 1963 bis Febr. 1964	Medizinalassistent an der Chirurgischen und Gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Niebüll/Schleswig.
März bis Okt. 1964	Medizinalassistent am Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses München rechts der Isar.
September 1965	Ärztliche Approbation
Seit März 1965	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Röntgenologie und Strahlenheilkunde der Universität München

